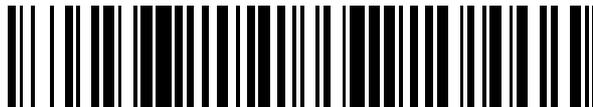


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 629 348**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/40 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.05.2011 PCT/EP2011/056964**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.11.2011 WO11138279**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.05.2011 E 11716587 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017 EP 2566509**

54 Título: **Anticuerpo novedoso contra una anhidrasa carbónica**

30 Prioridad:

03.05.2010 EP 10004646

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

08.08.2017

73 Titular/es:

**HELMHOLTZ ZENTRUM MÜNCHEN DEUTSCHES
FORSCHUNGSZENTRUM FÜR GESUNDHEIT UND
UMWELT (GMBH) (100.0%)
Ingolstädter Landstrasse 1
85764 Neuherberg, DE**

72 Inventor/es:

**ZEIDLER, REINHARD;
BATTKE, CHRISTINA;
KREMMER, ELISABETH;
FLATLEY, ANDREW y
SUPURAN, CLAUDIU**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 629 348 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

Anticuerpo novedoso contra una anhidrasa carbónica

5 La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a anhidrasa carbónica XII, en donde el anticuerpo comprende (a) las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 (CDR1), 2 (CDR2) y 3 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_H, y/o las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 4 (CDR1), 5 (CDR2) y 6 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_L.

10 Las anhidrasas carbónicas son una familia de enzimas que catalizan la hidratación reversible del ácido carbónico a bicarbonato y protones, y por tanto participan en el mantenimiento de la homeostasis del pH en el cuerpo (Badger y Price (1994), Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Bio., 45:369-392). En ausencia de un catalizador esta reacción se produce de forma bastante lenta. Puesto que la mayoría de las anhidrasas carbónicas contienen un ion cinc en su sitio activo se clasifican como que son metaloenzimas.

15 La familia de anhidrasas carbónicas tiene varios miembros. Hay al menos cinco subfamilias de AC distintas (α , β , γ , δ y ϵ). Estas subfamilias no tienen similitud de secuencia de aminoácidos significativa y en la mayoría de los casos se piensa que son un ejemplo de evolución convergente. Las anhidrasas carbónicas (AC) α se encuentran en mamíferos. Los miembros de esta subfamilia se pueden distinguir con respecto a su cinética, expresión tisular y localización subcelular (Kivela et al 2005).

20 Las enzimas AC- α se dividen en cuatro subgrupos amplios, esto es, en las AC citosólicas (AC-I, AC-II, AC-III, AC-VII y AC-XIII), las AC mitocondriales (AC-VA y AC-VB), las AC secretadas (AC-VI), y las AC asociadas a membrana (AC-IV, AC-IX, AC-XII, AC-XIV y AC-XV) (Breton et al. (2001), JOP 2(4 Supl):159-64). Además, hay tres isoformas de AC "catalíticas" (AC-VIII, AC-X y AC-XI) cuyas funciones no están claras. De todas estas AC existen además varias isoformas.

25 AC-II, AC-IX y AC-XII se han asociado con procesos neoplásicos, y son potenciales biomarcadores histológicos y pronósticos de varios tumores (Nordfors et al. (2010), BMC cancer; 10:148). AC-II es el miembro más ampliamente expresado de la familia génica de AC- α , que está presente en virtualmente cada tejido y órgano humano. Es catalíticamente una de las enzimas más eficaces conocidas. Está presente a algún nivel en células malignas, y, de forma interesante, se ha mostrado recientemente que se expresa ectópicamente en las células endoteliales de neovasos tumorales. La enzima transmembrana, AC-IX, primero se reconoció como un antígeno asociado a tumor novedoso expresado en varios tipos de carcinomas humanos, así como en tejido gastrointestinal normal. AC-IX se ha ligado funcionalmente a adhesión celular, diferenciación, proliferación y procesos oncogénicos, y su actividad enzimática es comparable a AC II. Otra isozima AC transmembrana, AC-XII, se encontró primero en tejido renal normal y carcinoma de células renales. Estudios adicionales han mostrado que se expresa en otros varios tumores (Ulmasov et al. (2000)), pero también en algunos órganos normales tal como el colon y el útero. La estructura cristalográfica de rayos X de AC-XII humana revela que es una proteína dimérica bitópica cuyo corto extremo C intracelular está colocado en el lado opuesto de los dominios del sitio activo de modo que la última cara es hacia el espacio extracelular.

30 La alta expresión de AC-II, AC-IX y AC-XII en tumores, particularmente en condiciones hipóxicas ha sugerido además que estas enzimas pueden participar funcionalmente en el proceso de invasión, que está facilitado por la acidificación del espacio extracelular. En favor de esta hipótesis, se ha mostrado in vitro que inhibidores de AC pueden reducir la capacidad de invasión y proliferación de células cancerosas (Manokaran et al. (2008), J Biomed Nanotechnol., 4(4):491-498). En particular, AC IX y XII parecen estar reguladas por mecanismos similares, ya que la transcripción de estas isozimas está inducida en tumores en condiciones hipóxicas a través de rutas mediadas por el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 α) (Chiche et al. (2009)). Además, se ha mostrado que la expresión de AC-XII está muy correlacionada con el receptor de estrógeno alfa (ER α) en tumores de mama (Barnett et al. (2008), Cancer Res 68:3505-3515). Para explicar la importancia de las AC en la evolución del cáncer en más detalle, las células tumorales que proliferan rápidamente enseguida crecen demasiado de modo que la difusión de oxígeno desde el vaso sanguíneo más próximo (100-150 μ m) se deteriora. Consecuentemente, las células tumorales reciben un bajo nivel de oxígeno, lo que produce centros hipóxicos locales y necrosis tisular. La hipoxia crea presión selectiva en las células para adoptar las condiciones de estrés, lo que produce la expresión de aproximadamente 50 proteínas adicionales, incluyendo las enzimas implicadas en la homeostasis del pH (Potter et al. (2004), Cell Cycle, 3:164-167). Como se ha explicado anteriormente, lo último se logra, al menos en parte, por una intrincada coordinación entre isozimas de anhidrasa carbónica (AC) seleccionadas, particularmente AC-II, AC-IX y AC-XII. Un enlace directo entre AC XII y cáncer ha sido demostrado por Proescholdt et al. (2005), Neuro Onco 7:465-475. Aquí se demuestra que la expresión de AC XII aumenta en tumores cerebrales intrínsecos y metastásicos comparado con tejido cerebral normal. Además, Ilie et al. (2011), In J Cancer, 128(7):1614-23 y Hynninen et al. (2006), Histopathology, 49:594-602 mostraron sobreexpresión de AC XII en tejidos de cáncer de pulmón no microcítico extirpable y cáncer de ovario, respectivamente. Hsieh et al. (2010), Eur J Cell Biol, 89:598-606 revelaron in vivo e in vitro que AC XII se asocia con invasión y metástasis de líneas de células tumorales.

65

Además, se usan inhibidores de AC, en particular inhibidores de AC-II y AC-XII para reducir la presión intraocular y por tanto tratar hipertensión ocular (Al-Barrag et al. (2009), *Clinical Ophthalmology* 3:357-362). Además, se mostró que los inhibidores de AC son útiles en el tratamiento de glaucoma (Haapasalo et al. (2008), *Neuro Oncology* 3:357-362, y Vullo et al. 2005).

5 Según esto, se sabe que las AC, y en particular AC-XII, desempeñan un papel en hipoxia, cáncer y enfermedades oculares y por tanto son importantes dianas para un tratamiento terapéutico o diagnóstico (Thiry et al 2008, Vullo et al 2005, y Haapasalo et al. (2008), *Neuro Oncology* 3:357-362). Aunque los inhibidores sistémicos de anhidrasas carbónicas se conocen en la técnica, se asocian con efectos secundarios adversos, tal como perturbación ácido-base, reacciones de hipersensibilidad, y anemia aplasmática letal (Gross et al. (1988), *Am J Ophthalmol.*, Naeser et al. (1986), *Acta Ophthalmol.*, 64:330-337, Mastropasqua et al. (1998), 212:318-321; y Passp et al. *Br J Ophthalmol.* 1985; 69:572-575). Por tanto, se requieren medios y métodos adicionales que se puedan emplear en el desarrollo de medios terapéuticos y diagnósticos adicionales para las enfermedades mencionadas anteriormente.

15 Esta necesidad se aborda mediante la provisión de las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

Según esto, la invención se refiere en una primera forma de realización a un anticuerpo que se une a anhidrasa carbónica XII, en donde el anticuerpo comprende (a) las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 (CDR1), 2 (CDR2) y 3 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_H, y/o las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 4 (CDR1), 5 (CDR2) y 6 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_L.

El término "anticuerpo", según la presente invención, comprende anticuerpos policlonales y monoclonales, así como derivados o fragmentos de los mismos que aún retienen la especificidad de unión. Los métodos para la producción de anticuerpos se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999. El término "anticuerpo" según la invención también incluye formas de realización tal como anticuerpos quiméricos, monocatenarios y humanizados, así como fragmentos de anticuerpo como, entre otros fragmentos Fab, proteínas de fusión que consisten en receptores Eph, dominios extracelulares de efrina o fosfatasa y Fc. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además F(ab')₂, fragmentos Fv o scFv; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit. En la técnica se conocen varios procedimientos y se pueden usar para la producción de tales anticuerpos y/o fragmentos. Por tanto, los derivados (de anticuerpo) se pueden producir por peptidomiméticos. Además, se pueden adaptar técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (véase, entre otros, la patente en EE UU 4.946.778) para producir anticuerpos monocatenarios específicos para polipéptido(s) y proteínas de fusión de esta invención. Además, se pueden usar animales transgénicos para expresar anticuerpos humanizados específicos para los polipéptidos y proteínas de esta invención. Lo más preferiblemente, el anticuerpo de esta invención es un anticuerpo monoclonal. Para la preparación de anticuerpos monoclonales se puede usar cualquier técnica que proporcione anticuerpos producidos por cultivos de líneas celulares continuos. Los ejemplos para tales técnicas incluyen la técnica original del hibridoma (Köhler y Milstein (1975) *Nature* 256, 495) desarrollada adicionalmente en la técnica, la técnica del trioma, la técnica del hibridoma de células B humanas (Kozbor (1983) *Immunology Today* 4, 72) y la técnica del hibridoma del EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., 77). Se puede usar resonancia de plasmón de superficie como se emplea en el sistema BIAcore para aumentar la eficacia de anticuerpos de fagos, que se unen a un epítipo de un polipéptido de la invención (Schier (1996) *Human Antibodies Hybridomas* 7, 97; Malmberg (1995) *J. Immunol. Methods* 183, 7). También se prevé en el contexto de esta invención que el término "anticuerpo" comprenda construcciones de anticuerpo, que se pueden expresar en células, por ejemplo, construcciones de anticuerpo que se pueden transfectar y/o transducir a través, entre otros, de virus o vectores plásmidos. El anticuerpo descrito en el contexto de la invención es capaz de específicamente unirse/interaccionar con un epítipo del polipéptido mencionado, preferiblemente AC-XII, definiéndose AC-XII posteriormente en el presente documento. El término "que específicamente se une/interacciona con" como se usa según la presente invención significa que el anticuerpo no o esencialmente no da reacción cruzada con un epítipo de estructura similar. La reactividad cruzada de un panel de anticuerpos en investigación se puede probar, por ejemplo, evaluando la unión de dicho panel de anticuerpos en condiciones convencionales al epítipo de interés, así como a un número de más o menos epítopos estrechamente relacionados (estructural y/o funcionalmente). Solo esos anticuerpos que se unen al epítipo de interés en su contexto relevante (por ejemplo, un motivo específico en la estructura de una AC, en particular AC-XII) pero no o esencialmente no se unen a ninguno de los otros epítopos se consideran específicos para el epítipo de interés y por tanto que son anticuerpos según esta invención. Se describen métodos correspondientes, por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988 y 1999, loc. cit. El anticuerpo específicamente se une a/interacciona con epítopos conformacionales o continuos, que son únicos para el polipéptido mencionado, preferiblemente AC-XII. Un epítipo conformacional o discontinuo se caracteriza para antígenos polipeptídicos por la presencia de dos o más residuos de aminoácidos discretos que están separados en la secuencia primaria, pero se juntan en la superficie de la molécula cuando el polipéptido se pliega en la proteína/antígeno nativo (Sela (1969) *Science* 166, 1365; Laver (1990) *Cell* 61, 553). Los dos o más residuos de aminoácidos discretos que contribuyen al epítipo están presentes en secciones separadas de una o más cadena(s) polipeptídica(s). Estos residuos se agrupan en la superficie de la molécula cuando la(s) cadena(s) polipeptídica(s) se pliega(n) en una estructura tridimensional para constituir un epítipo. En contraste, un epítipo continuo o lineal consiste en dos o más residuos de aminoácidos discretos, que están presentes en un único

segmento lineal de una cadena polipeptídica. Se pueden administrar anticuerpos, por ejemplo, como se describe en los documentos WO/2000/029019 y US 6.294.171. A este respecto, se menciona que el dominio catalítico de AC-XII cuya actividad catalítica se inhibe por el anticuerpo EXO 6A10 se muestra en la figura 6.

5 El término "CDR" se conoce bien en el estado de la técnica y especifica la región determinante de complementariedad (véase, por ejemplo, Harlow y Lane "Antibodies, a Laboratory Manual", CHS Press, Cold Spring Harbour, 1988). Una CDR es una secuencia de aminoácidos relativamente corta encontrada en los dominios variables (V) de un anticuerpo. Cada dominio variable (de la cadena pesada V_H y la cadena ligera V_L) de un anticuerpo comprende tres regiones determinantes de complementariedad algunas veces llamadas regiones hipervariables, flanqueadas por cuatro regiones marco relativamente conservadas o "FR". Las seis CDR de un anticuerpo esencialmente determinan la especificidad de un anticuerpo y hacen el contacto con un ligando específico.

15 El experto en la materia apreciará enseguida que el dominio variable del anticuerpo, que tiene las CDR anteriormente descritas (SEQ ID NO 1 a 6) se puede usar para la construcción de anticuerpos de especificidad y función biológica mejoradas adicionalmente. En tanto, la presente invención abarca anticuerpos que comprenden los dominios variables anteriormente descritos que ventajosamente tienen sustancialmente las mismas propiedades de unión, similares o mejoradas que el anticuerpo descrito en los ejemplos adjuntos.

20 Según esto, también se describe en el presente documento que los anticuerpos de la presente invención o sus cadena(s) de inmunoglobulinas correspondiente(s) se pueden modificar adicionalmente en al menos una sustitución(es) conservadora(s) de aminoácidos en cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 a 6. A este respecto, se prefiere con preferencia creciente que menos de 10, menos de 9, menos de 8, menos de 7, menos de 6, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2 aminoácidos, o 1 aminoácido se sustituya conservadoramente en cualquiera de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO. 1 a 6.

30 El término "sustitución conservadora" se usa ampliamente en el estado de la técnica y especifica la sustitución de un aminoácido en un polipéptido por un aminoácido con características similares. Características similares son, por ejemplo, tamaño, hidrofobicidad, o carga. Como se sabe bien, los aminoácidos se clasifican como que están positivamente cargados, negativamente cargados, que tienen una cadena lateral sin carga o una cadena lateral hidrofóbica. Los ejemplos para una sustitución conservadora son Leu a Ile, Arg por Lys, Phe a Trp, Asp a Glu, Ser a Thr, o viceversa. En general, el funcionamiento global de una secuencia de aminoácidos en particular de una secuencia de aminoácidos de CDR no es probable que esté esencialmente afectada por la sustitución conservadora e incluso puede mejorar.

35 Los métodos para introducir tales modificaciones, en particular, sustitución(es) de aminoácidos en la secuencia de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una CDR los conoce bien el experto en la materia; véase, por ejemplo, Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

40 El anticuerpo de la invención muestra propiedades ventajosas con respecto a su inhibición y actividad biológica. Como se puede ver de los ejemplos adjuntos, el anticuerpo EXO 6A10 que comprende las CDR que tienen SEQ ID NO: 1 a 6, inhibe la actividad enzimática de AC-XII 40 veces mejor comparado con sulfonamida acedazolamida (es decir, un inhibidor conocido de las AC, por ejemplo, de Kaur et al. (2002), Int J Pharm 248 (1-2): 1-14). Además, los ejemplos presentes muestran que el anticuerpo EXO 6A10 inhibe el crecimiento de la línea celular tumoral A549 (derivada de adenocarcinoma) en condiciones de cultivo hipotóxicas.

50 Hasta donde saben los inventores, EXO 6A10 es por tanto el primer anticuerpo identificado que inhibe la actividad de AC-XII en célula vivas. Esta es una prueba de concepto de la idoneidad del anticuerpo proporcionado por la invención para medios terapéuticos y diagnósticos de una enfermedad asociada con actividad anhidrasa carbónica y en particular la actividad de AC-XII.

55 El anticuerpo de la invención se espera que se una a varios miembros de las AC, preferiblemente las otras anhidrasas carbónicas α (AC) asociadas a membrana cuyas cavidades de sitio activo extracelular comparten homología (Alterio et al. (2009) PNAS 106:16233-16238). El anticuerpo de la invención se une a AC-XII asociada a membrana.

60 Se prefiere a este respecto que AC-XII sea AC-XII humana. Se prefiere además que el anticuerpo se una a al menos un epítipo del dominio extracelular de AC-XII (aminoácidos 25-301 de SEQ ID NO. 17), e incluso más preferido en la región del dominio catalítico discontinuo de AC-XII (aminoácidos 94-199 de SEQ ID NO: 17 (Whittington et al. (2001). El término "dominio extracelular" según la presente invención es un término bien conocido en la técnica y también se refiere junto con la presente invención a la parte de AC-XII que se extiende en el medio extracelular. También el término "dominio catalítico" según la presente invención es un término bien conocido en la técnica y también se refiere junto con la presente invención a la parte de AC-XII en la que se produce la catálisis de ácido carbónico a bicarbonato y protones.

65

Como se ha explicado en más detalle anteriormente, AC-XII se conoce por su papel en hipoxia, cáncer y enfermedad ocular, y por tanto es una diana importante para fines diagnósticos y médicos. Los fines diagnósticos y médicos de la presente invención se discuten en más detalle en el presente documento posteriormente.

- 5 En una forma de realización preferida la invención se refiere a un anticuerpo que comprende la región V_H determinada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región V_L determinada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.

10 Como se ha indicado en el presente documento anteriormente un anticuerpo tiene dos dominios variables, el dominio de la cadena pesada V_H , y el dominio de la cadena ligera V_L . SEQ ID NO. 7 y 8 muestran las secuencias de los dominios V_H y V_L del anticuerpo EXO 6A10 de la presente invención.

15 Se pueden preparar anticuerpos monoclonales, por ejemplo, por las técnicas bien establecidas como se describen originalmente en Kohler y Milstein, Nature 256 (1975), 495, y Galfre, Meth. Enzymol. 73 (1981), 3, que en este caso comprenden la fusión de células de mieloma de ratón a células de bazo derivadas de mamíferos inmunizados con modificaciones desarrolladas por la técnica.

20 A este respecto, se debe indicar que el anticuerpo EXO 6A10 de la presente invención es un anticuerpo monoclonal que se ha generado en una rata hacia la secuencia humana de AC-XII como se muestra en la figura 11 y codificado por el ácido nucleico como se muestra en la figura 12. Según esto, es particularmente preferido que el anticuerpo monoclonal de la invención sea un anticuerpo monoclonal de rata.

25 En otra forma de realización preferida el anticuerpo de la invención está acoplado a (a) un grupo marcador, (b) una toxina, o (c) un fármaco antitumoral.

30 A este respecto, el grupo marcador puede ser un hapteno o un colorante fluorescente, por ejemplo, seleccionado de FLAG, GFP, YFP, RFP, dTomato, cehrry, Cy3, Cy5, Cy 5.5, Cy 7, DNP, AMCA, biotina, digoxigenina, Tamra, Texas Red, rodamina, Alexa fluor, FITC, TRICT. Alternativamente, el grupo marcador puede ser un radioisótopo tal como, por ejemplo, 3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I o ^{131}I . Ejemplos adicionales de grupos marcadores adecuados son grupos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, galactosidasa de rábano, luciferasa, fosfatasa alcalina), grupos quimioluminiscentes, grupos biotínico, o epítopos polipeptídicos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo secuencias de pares de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, etiquetas epítopo).

35 El término "toxina" como se usa en el presente documento se refiere a cualquier compuesto producido por célula vivas u organismos y venenosas para una célula u organismo. Por tanto, una toxina, puede ser, por ejemplo, moléculas pequeñas, péptidos o proteínas. Los ejemplos específicos son neurotoxinas, necrotoxinas, hemotoxinas y citotoxinas.

40 El término "fármaco antitumoral" especifica según la invención un fármaco que es capaz de o bien parar o ralentizar el crecimiento anormal de tejido. Por tanto, los fármacos antitumorales son particularmente útiles en el tratamiento del cáncer. Un fármaco antitumoral puede ser un inhibidor de angiogénesis, intercaladores o entrecruzadores de ADN, inhibidores de la síntesis de ADN, reguladores de la transcripción ADN-ARN, inhibidores de enzimas, reguladores génicos, inhibidores de microtúbulos u otros agentes antitumorales.

45 Será aparente para los expertos en la materia que los anticuerpos de la invención se pueden acoplar a un grupo marcador, una toxina, o un fármaco antitumoral como se han definido en el presente documento anteriormente por métodos bien conocidos en la técnica. Tal acoplamiento se puede realizar químicamente después de la expresión del anticuerpo o antígeno al sitio de unión o el producto de acoplamiento se puede manipular en el anticuerpo o antígeno de la invención al nivel de ADN. Los ADN se expresan después en un sistema huésped adecuado como se describe en el presente documento posteriormente, y las proteínas expresadas se recogen y renaturalizan si es necesario. El acoplamiento se puede lograr a través de un enlazador conocido en el estado de la técnica. En particular, diferentes enlazadores que liberan la toxina, o un fármaco antitumoral en condiciones ácidas o reductoras o tras la exposición a proteasas específicas se pueden emplear con esta tecnología.

55 En ciertos aspectos, puede ser deseable, que el grupo marcador, toxina o fármaco antitumoral se una por brazos espaciadores de varias longitudes para reducir el potencial impedimento estérico.

60 En una forma de realización adicional la invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo según la invención.

65 La molécula de ácido nucleico de la invención que codifica el anticuerpo de la invención puede ser, por ejemplo, ADN, ADNc, ARN o ADN o ARN sintéticamente producido o molécula de ácido nucleico química recombinantemente producida que comprende cualquiera de esas moléculas de ácido nucleico sea sola o en combinación. La molécula de ácido nucleico también puede ser ADN genómico correspondiente al gen entero o una parte sustancial del mismo o a fragmentos o derivados del mismo. La secuencia de nucleótidos puede corresponder

a la secuencia de nucleótidos naturales o puede contener sustituciones, deleciones o adiciones de nucleótidos únicas o múltiples requeridas que el ácido nucleico de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican SEQ ID NO. 1 a 6 o SEQ ID NO 7 y 8, o comprende los ácidos nucleicos definidos por SEQ ID NO 9 a 15 o SEQ ID NO 15 y 16.

En una forma de realización particular de la presente invención, la molécula de ácido nucleico es una molécula de ADNc.

Una forma de realización de la invención también se refiere a un vector que comprende la molécula de ácido nucleico en una forma expresable.

El vector de la invención puede ser, por ejemplo, un fago, plásmido, vector vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes para replicación o defectuosos para replicación. En el último caso, la propagación vírica en general se producirá solo en huéspedes/células de complementación.

La molécula de ácido nucleico se puede insertar en varios vectores comercialmente disponibles. Los ejemplos no limitantes incluyen vectores plásmidos de procariontes, tal como la serie pUC, pBluescript (Stratagene), la serie pET de vectores de expresión (Novagen) o pCITOPO (Invitrogen) y vectores compatibles con una expresión en células de mamífero como pREP (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen), pMC1 neo (Stratagene), pXT1 (Stratagene), pSG5 (Stratagene), EBO-pSV2neo, pBPV-1, pdBPVMMTneo, pRSVgpt, pRSVneo, pSV2-dhfr, pIZD35, pLXIN, pSIR (Clontech), pIRES-EGFP (Clontech), pEAK-10 (Edge Biosystems) pTriEx-Hygro (Novagen) y pCINeo (Promega). Los vectores de expresión en plantas comprenden pGEM-T (Promega), pCAMBIA 1391 (Cambia), GATEWAY (Invitrogen), pGreen y pGreenII (PGREEN). Los ejemplos para vectores plásmidos para *Pichia pastoris* comprenden, por ejemplo, los plásmidos pAO815, pPIC9K y pPIC3.5K (todos de Invitrogen).

La molécula de ácido nucleico a que se hace referencia anteriormente también se puede insertar en vectores de modo que se genere una fusión de traducción con otro polinucleótido. Para técnicas de modificación de vectores, véase Sambrook y Russel (2001), loc. cit. En general, los vectores pueden contener uno o más orígenes de replicación (ori) y sistemas de herencia para clonación o expresión, uno o más marcadores para selección en el huésped, por ejemplo, resistencia a antibióticos, y uno o más casetes de expresión. Los orígenes de replicación (ori) adecuados incluyen, por ejemplo, los orígenes de replicación Col E1, el vírico de SV40 y de M 13.

Las secuencias codificantes insertadas en el vector se pueden, por ejemplo, sintetizar por métodos estándar, o aislar de fuentes naturales. La ligación de las secuencias codificantes a elementos reguladores de la transcripción y/u otras secuencias que codifican aminoácidos se puede llevar a cabo usando métodos establecidos. Los elementos reguladores de la transcripción (partes de un casete de expresión) que aseguran la expresión en células procariontes o eucariotas los conocen bien los expertos en la materia. Estos elementos comprenden secuencias reguladoras que aseguran el inicio de la transcripción (por ejemplo, codón de inicio de la traducción, promotores, tal como promotores naturalmente asociados o heterólogos y/o aislantes), sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) (Owens, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (2001), 1471-1476) y opcionalmente señales poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales, así como de traducción. Preferiblemente, el polinucleótido de la invención está operativamente unido a tales secuencias de control de la expresión que permiten la expresión en células procariontes o eucariotas. El vector puede comprender además secuencias de nucleótidos que codifican señales de secreción como elementos reguladores adicionales. Tales secuencias las conoce bien el experto en la materia. Además, dependiendo del sistema de expresión usado, secuencias líder capaces de dirigir el polipéptido expresado a un compartimento celular se pueden añadir al polinucleótido de la invención. Tales secuencias líder se conocen bien en la técnica.

Además, se prefiere que el vector comprenda un marcador de selección. Los ejemplos de marcadores de selección incluyen resistencia a neomicina, ampicilina, e higromicina, kanamicina y similares.

Un vector de expresión según esta invención es capaz de dirigir la replicación, y la expresión, del polinucleótido y anticuerpo codificado de esta invención. Los vectores de expresión adecuados que comprenden los elementos reguladores descritos se conocen en la técnica. A este respecto, se indica que la región V_H y V_L del anticuerpo de la invención pueden estar codificadas por vectores de expresión diferentes.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento anteriormente se pueden diseñar para la introducción directa o para introducción a través de liposomas, vectores fagos, o vectores víricos (por ejemplo, adenovíricos, retrovíricos) en un huésped. Además, se pueden usar sistemas de baculovirus o sistemas basados en virus vaccinia o virus del bosque Semliki como sistemas de expresión eucariotas para moléculas de ácido nucleico de la invención.

Un vector de expresión en mamíferos típico contiene el elemento promotor, que media el inicio de la transcripción de ARNm, la secuencia codificante de proteína, y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Además, también se pueden incluir elementos tales como origen de replicación, gen de resistencia a fármacos, reguladores (como parte de un promotor inducible). El promotor *lac* es un promotor inducible

típico, útil para células procariotas, que se puede inducir usando el análogo de lactosa isopropil- β -tiogalactopiranosido ("IPTG"). Para la expresión recombinante y secreción, el polinucleótido de interés se puede ligar entre, por ejemplo, la señal líder PelB, que dirige la proteína recombinante al periplasma y el gen III en un fagémido llamado pHEN4 (descrito en Ghahroudi et al, 1997, FEBS Letters 414:521-526). Los elementos adicionales podrían incluir potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donantes y aceptores para ajuste de ARN. Se puede alcanzar transcripción muy eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLV1, HIV1, y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también se pueden usar elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humana). Alternativamente, el polipéptido recombinante se puede expresar en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma. La cotransfección con un marcador de selección tal como dhfr, gpt, neomicina, higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas. El ácido nucleico transfectado también se puede amplificar para expresar grandes cantidades del polipéptido codificado. Como se ha indicado anteriormente, los vectores de expresión preferiblemente incluirán al menos un marcador de selección. Tales marcadores incluyen dihidrofolato reductasa, resistencia a G418 o neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a tetraciclina, kanamicina o ampicilina para cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Los ejemplos representativos de los huéspedes apropiados incluyen, pero no están limitados a, células bacterianas, tal como *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tal como células de levadura; células de insecto tal como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera*; células animales tal como CHO, COS, HEK 293 y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios y condiciones de cultivo apropiados para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica.

Otra forma de realización de la invención se refiere a un huésped no humano que comprende el vector de la invención.

Dicho huésped puede ser una célula procariota o eucariota. El polinucleótido o vector de la invención que está presente en la célula huésped puede estar integrado en el genoma de la célula huésped o se puede mantener de forma extracromosómica. A este respecto, también se debe entender que la molécula de ácido nucleico de la invención se puede usar para "direccionamiento génico" y/o "sustitución génica", para restablecer un gen mutante o para crear un gen mutante a través de recombinación homóloga; véase, por ejemplo, Mouellic, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 (1990), 4712-4716; Joyner, Gene Targeting, A Practical Approach, Oxford University Press.

Las células huésped procariotas adecuadas comprenden, por ejemplo, bacterias de las especies *Escherichia*, *Bacillus*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*. Las células huésped eucariotas adecuadas son, por ejemplo, células fúngicas, entre otras, levaduras tal como *Saccharomyces cerevisiae* o *Pichia pastoris* o células de insecto tal como células S2 de *Drosophila* y Sf9 de *Spodoptera* y células vegetales, así como células de mamífero. Los medios y condiciones de cultivo apropiadas para las células huésped descritas anteriormente se conocen en la técnica. Las células huésped de mamífero que se podrían usar incluyen células Hela, HEK293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, Cos 1, Cos 7 y CV1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón, células C2C12 de ratón, BHK (células de riñón de hámster recién nacido) y células de ovario de hámster chino (CHO). También están en el ámbito de la presente invención huéspedes tal como células primarias de mamíferos tal como fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Alternativamente, el anticuerpo recombinante se puede expresar en líneas celulares estables que contienen la construcción génica integrada en un cromosoma. En una forma de realización más preferida, dicha célula es una célula primaria o una línea celular primaria. Las células primarias son células que se obtienen directamente de un organismo.

La invención también se refiere a animales transgénicos no humanos que comprenden una o más moléculas de ácido nucleico de la invención que se pueden usar para producir el anticuerpo de la invención. Los anticuerpos se pueden producir en y recuperar de tejido o líquidos corporales, tal como leche, sangre u orina, de cabras, vacas, caballos, cerdos, ratas, ratones, conejos, hámsteres u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las patentes en EE UU No. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.

En una forma de realización adicional, la invención se refiere a un método para producir un anticuerpo de la invención, que comprende (a) cultivar el huésped de la invención en condiciones que permiten la síntesis de dicho anticuerpo; y (b) recuperar dicho anticuerpo de dicho cultivo.

Los huéspedes transformados se pueden hacer crecer en fermentadores y cultivar según métodos conocidos en la técnica para alcanzar crecimiento celular óptimo. Una vez expresados, los anticuerpos enteros de la presente invención, se pueden purificar según procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares; véase, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). El anticuerpo o su(s) cadena(s) de inmunoglobulina correspondiente(s) de la invención se puede aislar después del medio de cultivo, lisados celulares, o fracciones de membrana celular. El aislamiento y purificación de, por ejemplo, anticuerpos o cadenas de inmunoglobulinas microbianamente expresados de la invención puede ser por cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tal como las que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos, por ejemplo, contra la región constante del anticuerpo de la invención.

En otra forma de realización la invención se refiere a una composición diagnóstica que comprende el anticuerpo de la invención.

5 El término "composición" como se emplea en el presente documento define una composición que comprende al menos un anticuerpo, molécula de ácido nucleico, vector y/o huésped de la invención que también se denomina en lo que sigue colectivamente compuesto.

10 La composición diagnóstica de la invención es útil en la detección de una expresión indeseada o sobreexpresión de una AC, en particular AC-IX o AC-XII en diferentes células, tejidos u otra muestra adecuada, que comprende poner en contacto una muestra con un anticuerpo de la invención, y detectar la presencia de una AC, en particular AC-IX o AC-XII en la muestra. Según esto, la composición diagnóstica de la invención se puede usar para evaluar el inicio o el estado de enfermedad como se define en el presente documento posteriormente. En particular, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo de la invención se puede dirigir a células malignas, tal como células cancerosas que expresan una AC, en particular AC-IX o AC-XII. Las células que se han unido al anticuerpo de la invención podrían ser por tanto atacadas por las funciones del sistema inmunitario tal como el sistema del complemento o por citotoxicidad mediada por células, reduciendo de esta manera en número de o erradicando células que muestran expresión indeseada o sobreexpresión de una AC, en particular AC-IX o AC-XII.

20 En un aspecto de la presente invención descrita en el presente documento anteriormente, el anticuerpo, fragmento de anticuerpo o derivado del mismo de la invención se acopla a un grupo marcador. Tales anticuerpos son particularmente adecuados para aplicaciones diagnósticas.

25 La composición diagnóstica de la invención se puede administrar como el único principio activo o se puede administrar en combinación con otros agentes.

En una forma de realización adicional la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención.

30 La composición farmacéutica preferiblemente se administra a mamíferos tal como animales domésticos y mascotas. Lo más preferido se administra a seres humanos. Las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se pueden administrar al sujeto en una dosis adecuada. La composición farmacéutica para uso según la presente invención se puede formular de forma convencional según métodos encontrados en la técnica, usando uno o más soportes o excipientes fisiológicos, véase, por ejemplo, Ansel et al., "Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems", 7ª edición, Lippincott Williams & Wilkins Publishers, 1999. La composición farmacéutica se puede, según esto, administrar por vía oral, parenteral tal como por vía subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, transdérmica, transmucosa, subdural, local o tópica a través de iontoforesis, por vía sublingual, por spray de inhalación, aerosol o por vía rectal y similares en formulaciones farmacéuticas que comprenden opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables convencionales.

40 Para la administración oral, la composición farmacéutica de la invención puede tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos o cápsulas preparadas por medios convencionales con excipientes farmacéuticos aceptables tal como agentes aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa), rellenos (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina, hidrogenofosfato de calcio), lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco, sílice), disgregantes (por ejemplo, fécula de patata, glicolato sódico de almidón), o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). La composición farmacéutica se puede administrar con un soporte fisiológicamente aceptable a un paciente como se describe en el presente documento. El término "soporte" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el agente terapéutico. Tales soportes farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tal como agua y aceites, incluyendo los de petróleo, origen animal, vegetal o sintético, tal como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de vaselina, aceite de sésamo y similares. El agua es un soporte preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También se pueden emplear soluciones salinas y dextrosa acuosa y soluciones de glicerol como soportes líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de magnesio, monoestearato de glicerol, talco, ion sodio, lecho en polvo desnatada, glicerol, propilenglicol, agua, etanol, y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades minoritarias de agentes emulsionantes o agentes reguladores del pH. Estas composiciones pueden estar en forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación sostenida y similares. La composición se puede formular como un supositorio, con aglutinantes y soportes tradicionales tal como triglicéridos. La formulación oral puede incluir soportes estándar tal como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de soportes farmacéuticos adecuados en "Remington's Pharmaceutical Sciences" por E.W. Martin. Tales composiciones contendrán una cantidad terapéuticamente eficaz de los compuestos anteriormente mencionados, preferiblemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de soporte de modo que proporcionen la forma para la administración adecuada al paciente. La formulación se debe adecuar a la forma de administración.

65

Las preparaciones líquidas para administración oral pueden estar en forma de, por ejemplo, soluciones, jarabes, o suspensiones, o se pueden presentar como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Tal preparación líquida se puede preparar por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tal como agentes de suspensión (por ejemplo, sorbitol, jarabe, derivados de celulosa, grasas comestibles hidrogenadas), agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina, goma arábiga), vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres graos, alcohol etílico, aceites vegetales fraccionados), conservantes (por ejemplo, p-hidroxicarbonatos de metilo o propilo, ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales de tampones, agentes saborizantes, colorantes y edulcorantes como se juzgue apropiado. Las preparaciones para la administración oral se pueden formular adecuadamente para dar liberación controlada de la composición farmacéutica de la invención.

Para la administración por inhalación, la composición farmacéutica de la invención se administra convenientemente en forma de una presentación de spray aerosol de un paquete presurizado o un nebulizador, con el uso de un propelente adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosis se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad medida. Se pueden formular cápsulas y cartuchos de, por ejemplo, gelatina, para uso en un inhalador o insuflador que contienen una mezcla en polvo de la composición farmacéutica de la invención y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular para administración parental por inyección, por ejemplo, por inyección embolada o infusión continua. El sitio de las inyecciones incluye intravenoso, intraperitoneal o subcutáneo. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas farmacéuticas unitarias (por ejemplo, en ampolla, en envase multidosis, ampollas o viales sellados, como una solución acuosa o como una formulación liofilizada para reconstitución), y con un conservante añadido. La composición farmacéutica de la invención puede tomar tales formas como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos, y puede contener agentes de formulación tal como agentes de suspensión, estabilización o dispersión. Alternativamente, el agente puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado (por ejemplo, agua estéril sin pirógenos) antes del uso. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lignocaína para aliviar el dolor en el sitio de inyección. En general, los ingredientes se suministran bien por separado o mezclados en forma farmacéutica unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado sin agua en un envase herméticamente sellado tal como una ampolla o bolsita indicando la cantidad de principio activo. Donde la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Donde la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua para inyección o solución salina estéril de modo que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular para administración transdérmica. Las composiciones transdérmicas típicamente se formulan como una pomada o crema transdérmica que contiene el/los principio(s) activo(s), en general en una cantidad que varía desde aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 20% en peso, preferiblemente desde aproximadamente el 0,1 hasta aproximadamente el 10% en peso, y más preferiblemente desde aproximadamente el 0,5 hasta aproximadamente el 15% en peso. Cuando se formula como una pomada, los principios activos típicamente se combinan con una base de pomada parafínica o miscible con agua. Alternativamente, los principios activos se pueden formular en una crema con, por ejemplo, una base de crema de aceite en agua. Tales formulaciones transdérmicas se conocen bien en la técnica y en general incluyen ingredientes adicionales para aumentar la penetración dérmica de estabilidad de los principios activos o la formulación. Todas de tales formulaciones transdérmicas e ingredientes conocidos están incluidos en el ámbito de esta invención. Los compuestos de esta invención también se pueden administrar por un dispositivo transdérmico. Según esto, la administración transdérmica se puede alcanzar usando un parche sea de tipo depósito o de membrana porosa, o de una variedad de matriz sólida.

La composición farmacéutica de la invención se puede formular como formas neutras o de sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tal como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tal como los derivados de hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

La composición farmacéutica de la invención también se puede, si se desea, presentar en un paquete o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el dicho agente. El paquete puede comprender, por ejemplo, hoja de metal o plástico, tal como un blíster. El paquete o dispositivo dispensador se puede acompañar con instrucciones para la administración.

La composición farmacéutica de la invención se puede administrar como el único principio activo o se puede administrar en combinación con otros agentes, preferiblemente los que se sabe en la técnica que son adecuados para el tratamiento de la enfermedad en cuestión.

La composición farmacéutica en general se formula mezclándola al grado deseado de pureza, en una forma farmacéutica unitaria inyectable (solución, suspensión o emulsión), con un soporte farmacéuticamente aceptable, es decir, uno que sea no tóxico para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas y sea compatible con los otros ingredientes de la formulación.

5 En general, las formulaciones se preparan poniendo en contacto los componentes de la composición farmacéutica uniforme e íntimamente con soportes líquidos o soportes sólidos finamente divididos o ambos. Después, si es necesario, el producto se da forma en la formulación deseada. Los ejemplos de tales vehículos soporte incluyen agua, solución salina, solución de Ringer, y solución de dextrosa. Los vehículos no acuosos tal como aceites no volátiles y oleato de etilo también son útiles en el presente documento, así como liposomas. El soporte adecuadamente contiene cantidades minoritarias de aditivos tal como sustancias que aumentan la isotonicidad y estabilidad química. Tales materiales son no tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tal como fosfato, citrato, succinato, ácido acético, y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tal como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas, tal como seroalbúmina, gelatina, polímeros hidrofílicos tal como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tal como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos, y otros hidratos de carbono incluyendo celulosa o sus derivados, glucosa, manosa, o dextrinas; agentes quelantes tal como EDTA; polioles tal como manitol o sorbitol; contraiones tal como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tal como polisorbatos, poloxámeros, o PEG.

Los componentes de la composición farmacéutica que se va a usar para administración terapéutica deben ser estériles. La esterilidad se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Los componentes terapéuticos de la composición farmacéutica generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

Según una forma de realización de la invención el anticuerpo de la invención es para uso en tratar o inhibir hipoxia, un tumor sólido o una enfermedad ocular.

30 También se describe en el presente documento un método para tratar o inhibir hipoxia, un tumor sólido, o una enfermedad ocular administrando una cantidad eficaz de la molécula de ácido nucleico de la invención, el vector de la invención o el huésped de la invención a un sujeto en necesidad de ello.

A este respecto, el término "hipoxia" se refiere a un estado patológico en el que el cuerpo como un todo (hipoxia generalizada) o una región del cuerpo (hipoxia de tejido) está privado de suministro adecuado de oxígeno. Por ejemplo, un mal emparejamiento entre el suministro de oxígeno y su demanda a nivel celular puede producir un estado hipóxico. La hipoxia en la que hay privación completa de suministro de oxígeno se denomina anoxia y por tanto está abarcada por el término paraguas hipoxia.

40 El término "tumor sólido" según la invención define una masa anormal de tejido que habitualmente no contiene quistes o áreas líquidas. Los tumores sólidos pueden ser benignos (no cáncer) o malignos (con frecuencia denominados en la técnica cáncer). Los diferentes tipos de tumores sólidos se nombran por el tipo de células que los forman. Los ejemplos de tumores sólidos se proporcionan en el presente documento posteriormente.

45 El término "enfermedad ocular" como se usa en el presente documento se refiere a un estado patológico o lesión del ojo incluyendo sus anexos. Una enfermedad ocular puede implicar, por ejemplo, el enturbiamiento u opacificación de la lente natural del ojo, hinchazón de la mácula, por ejemplo, resultante de la liberación y acumulación de líquido o de la retina central, pequeñas acumulaciones de cuerpos hialinos debajo de la retina, daños del nervio óptico, degeneración de las células de la mácula lútea, pérdida de visión o inflamación de la conjuntiva y córnea del ojo, y la formación de tejido cicatricial. Los ejemplos de una enfermedad ocular se proporcionan en el presente documento posteriormente.

50 Como apreciará el experto en la materia y como es evidente en particular de la información proporcionada en la parte introductoria, que se incorpora mediante referencia en el presente documento, el anticuerpo, la molécula de ácido nucleico, el vector o el huésped de la invención son particularmente útiles en tratar o inhibir las enfermedades particulares mencionadas en el presente documento.

En una forma de realización preferida de la invención, la hipoxia se selecciona de hipoxia tumoral, hipoxia neuronal, hipoxia cerebral, estenosis e isquemia.

60 En una forma de realización preferida adicional de la invención, el tumor sólido se selecciona de sarcoma, glioma, carcinoma, mesotelioma, linfoma, tumor de riñón, tumor pulmonar, tumor mamario, tumor cervical, tumor ovárico, tumor colorrectal, tumor hepático, tumor de próstata, tumor de páncreas y tumor de cabeza y cuello.

En otra forma de realización preferida de la invención la enfermedad ocular se selecciona de hipertensión ocular, glaucoma, degeneración macular, degeneración macular senil, uveítis, retinitis, retinosquiasis ligada a X y retinopatía hipertensa.

5 Las figuras muestran:

Figura 1: Función de las anhidrasas carbónicas (tomado de Innocenti et al., 2007). Interacción de citosólica (AC-II) y transmembrana (AC-IX y XII) con otras proteínas implicadas en la homeostasis de pH y el transporte de aniones tal como (1) el transportador de monocarboxilato, (2) el antiportador de $\text{Na}^+\text{-H}^+$; (3) los antiportadores de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ dependientes de ATP; (4) la $\text{H}^+\text{-ATPasa}$; (5) acuaporinas; (6) AC unidas a membrana (AC-IX, XII o XIV); (7) intercambiadores de aniones (EA) de bicarbonato/cloruro.

Figura 2: Niveles de expresión de AC-XII en diferentes tipos de cáncer humano.

15 **Figura 3:** La tinción inmunofluorescente de células A549 con el anticuerpo EXO 6A10 y un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo revela la localización asociada a membrana de AC-XII.

Figura 4: A: Expresión de AC-XII en la superficie celular de líneas celulares cancerosas humanas y células mononucleares de sangre periférica (CMSP) revelada por citometría de flujo (área gris = control de isotipo; línea negra = EXO 6A10). B: AC-XII en exosomas aislados de ascitis malignos de una paciente con cáncer ovárico, como se muestra con inmunotransferencia. GM1 = gangliósido M1 (un marcador exosómico); iso = control de isotipo.

Figura 5: Parte superior: Inhibición por EXO 6A10 de AC-XII ($\text{CI}_{50} = 6,14 \times 10^{-9}$ M) y la sulfonamida acetazolamida ($\text{CI}_{50} = 2,38 \times 10^{-7}$ M). Parte inferior: Inhibición por EXO 6A10 de AC-II.

25 **Figura 6:** Residuos de aminoácidos relevantes del dominio catalítico discontinuo de AC-XII para la interferencia de EXO 6A10 con la actividad de AC-XII (tomado de Whittington et al., 2001).

Figura 7: Inhibición por EXO 6A10 de la actividad metabólica en esferoides tumorales tridimensionales. Parte superior: Los esferoides se cultivaron en presencia de EXO 6A10 (concentración final 10 $\mu\text{g/ml}$), con acetazolamida (AAZ, concentración final 100 μM) y los esferoides control se cultivaron sin ningún tratamiento adicional (sin tratar). Se midió la actividad metabólica de los esferoides dos días después por medio de un ensayo MTT y lectura de la extinción a 595 nm (Cory et al. 1991) Todos los datos se representan como media \pm error estándar. Las comparaciones entre esferoides no tratados y tratados se realizaron usando pruebas de la t.

35 Parte inferior: Imágenes tomadas de esferoides A549 que se cultivaron durante dos días con EXO 6A10 o se dejaron sin tratar y posteriormente se trataron con bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Figura 8: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina del hibridoma que produce el anticuerpo EXO 6A10 (= hibridoma 6A10). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1-3, que constituyen la interacción de la inmunoglobulina con el antígeno, están marcadas en amarillo. Se identificaron las CDR según los criterios descritos en Chothia et al., 1989.

Figura 9: Secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina del hibridoma que produce el anticuerpo EXO 6A10 (= hibridoma 6A10). Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) 1-3, que constituyen la interacción de la inmunoglobulina con el antígeno, están marcadas en negrita y subrayadas. Se identificaron las CDR según los criterios descritos en Chothia et al., 1989.

Figura 10: Unión de EXO 6A10 en células L929 murinas transfectadas con un plásmido de expresión que codifica AC-XII humana (línea negra, L929 + AC-XII) y unión de EXO 6A10 a células L929 no transfectadas, como control (área gris, L929) revelada por citometría de flujo.

Figura 11: Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la secuencia publicada de AC-XII, isoforma 1 y la traducción in silico del ADNc que se clonó por RT-PCR. Es evidente que ambas secuencias son idénticas.

55 **Figura 12:** Alineamiento de las secuencias de nucleótidos publicadas de AC-XII, isoforma 1 y el ADNc que se clonó por RT-PCR. Es evidente que ambas secuencias son idénticas.

Figura 13: Inducción de la expresión de AC XII en líneas celulares de glioblastoma por hipoxia. Las células se cultivaron en condiciones de O_2 al 21% (normoxia) o de O_2 al 1% (hipoxia). La expresión en superficie de ACXII se midió por citometría de flujo usando el anticuerpo EXO 6A10. Línea negra = EXO 6A10, histograma gris = control de isotipo.

Los ejemplos ilustran la invención.

65 **Ejemplo 1 – Niveles de expresión de AC-XII en diferentes tipos de cáncer humano**

AC-XII se expresa mucho en diferentes tipos de cáncer humano. La sobreexpresión de AC XII es más evidente en cáncer de mama, abogando por los datos descritos en Bernett et al. (2008). (tomados de: <http://ist.genesapiens.org>).

Ejemplo 2 – Tinción inmunofluorescente de células A549

Las células A549 se fijaron durante 10 minutos con paraformaldehído al 4% (v/v) en PBS, se lavaron con PBS y Triton X-100 al 0,5% (v/v) en PBS, y se incubaron con el anticuerpo EXO 6A10 durante 60 min a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS y PBS/Triton X-100 al 0,5% (v/v), las células se incubaron con un anticuerpo secundario marcado con fluorocromo (anti-IgG de rata en ratón/Cy3) y el anticuerpo unido se visualizó después mediante un microscopio de barrido laser Leica. Los núcleos se contratiñeron con DAPI. Como resultado, la tinción de AC-XII está claramente asociada con la membrana de las células A549 (figura 3, puntas de flecha).

Ejemplo 3 – Las líneas celulares cancerosas humanas investigadas expresan AC-XII

Las líneas celulares cancerosas humanas más permanentes investigadas expresan AC-XII en la superficie celular como se reveló por citometría de flujo; cf. Figura 4 A. Las líneas celulares cancerosas humanas permanentes se incubaron con EXO 6A10 (sobrenadante del hibridoma diluido 1:5 en SFT (es decir, suero fetal de ternera) al 2% (v/v) en PBS) durante 15 min en hielo, se lavaron tres veces en PBS/SFT al 2% (v/v) y después se tiñeron con un anticuerpo secundario específico (anti-IgG de rata en cabra/Cy5) durante otros 15 min en hielo. La unión de 6A10 se midió después por citometría e flujo en un dispositivo FACS Calibur de Becton Dickinson y software FlowJo (Treestar Inc.). Se usó un anticuerpo del isotipo idéntico con especificidad irrelevante (glutación-S-transferasa) como control (área gris = control de isotipo; línea negra = EXO 6A10). No fue detectable la unión a células mononucleares de sangre periférica (CMSP) y a dos líneas celulares de melanoma (no mostrado). La figura 4 B muestra que AC-XII también está presente en exosomas aislados de ascitis malignos de una paciente con cáncer ovárico, como se muestra con esta inmunotransferencia. Los exosomas se aislaron de ascitis malignos por centrifugación diferencial (500 x g; 10.000 x g; 70.000 x g) y se resuspendieron en PBS. La concentración de proteína se midió en un ensayo de Bradford estándar. Se pipetearon 2 µg de proteína en una membrana de nitrocelulosa. Las membranas se incubaron con los diferentes anticuerpos primarios. Después de lavar, las membranas se incubaron con un anticuerpo secundario específico (anti-IgG de rata/peroxidasa). Se detectó gangliósido GM1 con la subunidad B de la toxina del cólera/peroxidasa. Las membranas se revelaron con el sistema ECL.

Ejemplo 4 – Inhibición de AC-XII por EXO 6A10 y acetazolamida

EXO 6A10 inhibe AC-XII ($CI_{50} = 6,14 \times 10^{-9}$ M) mucho más eficazmente comparado con la sulfonamida acetazolamida ($CI_{50} = 2,38 \times 10^{-7}$ M); cf. Figura 5, parte superior. En contraste EXO 6A10 no inhibe significativamente AC-II; cf. Figura 5, parte inferior.

Ejemplo 5 – Unión de EXO 6A10 a AC-XII

Estructura tridimensional del dominio catalítico de AC-XII. Se muestran los residuos de aminoácidos relevantes (tomado de Whittington et al., 2001).

Ejemplo 6 – Inhibición por EXO 6A10 de la actividad metabólica en esferoides tumorales tridimensionales

Se sembraron células de cáncer pulmonar A549 en un colchón consistente en agarosa al 1% (v/v) en PBS en una placa de cultivo celular de 96 pocillos. En estas condiciones, la mayoría de las líneas celulares que crecen como monocapa en cultivo celular estándar no se adhieren a la agarosa. En su lugar las células espontáneamente forman estructuras tridimensionales denominadas esferoides tumorales.

Figura 7, parte superior: Algunos de los esferoides se cultivaron en presencia de EXO 6A10 (concentración final 10 µg/ml), mientras que otros se cultivaron con acetazolamida (AAZ, concentración final 100 µM). Los esferoides control se cultivaron sin ningún tratamiento adicional (sin tratar). Se midió la actividad metabólica de los esferoides dos días después por medio de un ensayo MTT como se ha descrito y lectura de la extinción a 595 nm (Cory et al. 1991). Para cada grupo, se incluyeron 10 esferoides, se calcularon el valor medio, la desviación estándar. Todos los datos se representan como media ± error estándar. Las comparaciones entre esferoides no tratados y tratados se realizaron usando pruebas de la t, calculadas usando Prism4 (GraphPad Software, La Jolla).

Figura 7, parte inferior: Se cultivaron esferoides de A549 durante dos días con EXO 6A10 o se dejaron sin tratar. A continuación, se añadió bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio y se tomaron imágenes. Es obvio que los esferoides tratados con EXO 6A10 son mucho más pequeños y mucho más densos que los esferoides sin tratar.

Ejemplo 7 – Transfección de células L929 murinas con un plásmido de expresión que codifica AC-XII humana

Se transfectaron células L929 murinas con un plásmido de expresión que codifica AC-XII humana. La unión de EXO 6A10 se reveló después por citometría de flujo (figura 10, línea negra, L929 + AC-XII). Como control, se probó la unión de EXO 6A10 a células L929 sin transfectar (figura 10, área gris, L929). EXO 6A10 se une a las células transfectadas, pero no a las no transfectadas. Como resultado, indicar la unión de AC-XII humana sobreexpresada localizada en la membrana.

Ejemplo 8 – Cultivo de líneas celulares de glioblastoma U373 y U251 en normoxia o condiciones hipóxicas

AC XII se asocia con hipoxia en cáncer humano. Se cultivaron las líneas celulares de glioblastoma U373 y U251 bien en normoxia (aprox. O₂ al 21%) o en condiciones hipóxicas (O₂ al 1%). Mientras que AC XII no se expresaba detectablemente en condiciones normóxicas (histogramas a la izquierda), la enzima se inducía claramente cuando las células se mantenían en hipoxia (figura 13). Estos resultados implican que AC XII es una enzima importante para células cancerosas hipóxicas.

Referencias:

Alterio, V., Hilvo, M., Di Fiore, A., Supuran, C. T., Pan, P., Parkkila, S., Scaloni, A., Pastorek, J., Pastorekova, S., Pedone, C., Scozzafava, A., Monti, S. M., y De Simone, G. (2009). Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16233-16238.

Barnett, D. H., Sheng, S., Charn, T. H., Waheed, A., Sly, W. S., Lin, C. Y., Liu, E. T., y Katzenellenbogen, B. S. (2008). Estrogen receptor regulation of carbonic anhydrase XII through a distal enhancer in breast cancer. *Cancer Res* 68, 3505-3515.

Chiche, J., Ilc, K., Laferrriere, J., Trottier, E., Dayan, F., Mazure, N. M., Brahimi-Horn, M. C., y Pouyssegur, J. (2009). Hypoxia-inducible carbonic anhydrase IX and XII promote tumor cell growth by counteracting acidosis through the regulation of the intracellular pH. *Cancer Res* 69, 358-368.

Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R., y et, a. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342, 877-883.

Cory, A. H., Owen, T. C., Bartrop, J. A., y Cory, J. G. (1991). Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. *Cancer Commun* 3, 207-212.

Innocenti, A., Vullo, D., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., Nishimori, I., y Supuran, C. T. (2007). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of transmembrane isozymes XII (cancer-associated) and XIV with anions. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 1532-1537.

Kivela, A., Parkkila, S., Saarnio, J., Karttunen, T. J., Kivela, J., Parkkila, A. K., Waheed, A., Sly, W. S., Grubb, J. H., Shah, G., Tureci, O., y Rajaniemi, H. (2000). Expression of a novel transmembrane carbonic anhydrase isozyme XII in normal human gut and colorectal tumors. *Am J Pathol* 156, 577-584.

Thiry, A., Supuran, C. T., Masereel, B., y Dogne, J. M. (2008). Recent developments of carbonic anhydrase inhibitors as potential anticancer drugs. *J Med Chem* 51, 3051-3056.

Ulmasov, B., Waheed, A., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., Tu, C., y Silverman, D. N. (2000). Purification and kinetic analysis of recombinant CA XII, a membrane carbonic anhydrase overexpressed in certain cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14212-14217.

Vullo, D., Innocenti, A., Nishimori, I., Pastorek, J., Scozzafava, A., Pastorekova, S., y Supuran, C. T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the transmembrane isozyme XII with sulfonamides-a new target for the design of antitumor and antiglaucoma drugs? *Bioorg Med Chem Lett* 15, 963-969.

Whittington, D. A., Waheed, A., Ulmasov, B., Shah, G. N., Grubb, J. H., Sly, W. S., y Christianson, D. W. (2001). Crystal structure of the dimeric extracellular domain of human carbonic anhydrase XII, a bitopic membrane protein overexpressed in certain cancer tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9545-9550.

Lista de secuencias

<110> Helmholtz Zentrum München
ZEIDLER, Reinhard

<120> ANTICUERPO NOVEDOSO CONTRA UNA ANHIDRASA CARBÓNICA

<130> S1687 PCT

<150> EP10004646.5
 <151> 03-05-2010

 <160> 18
 5 <170> PatententIn Versión 3.3

 <210> 1
 <211> 11
 10 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 1
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Ser Ile His
 1 5 10
 15
 <210> 2
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 20
 <400> 2
 Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 1 5

 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 25
 <400> 3
 Gln Gln Thr Tyr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe
 1 5 10
 30
 <210> 4
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 35
 <400> 4
 Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Ser Val Ser
 1 5 10
 40
 <210> 5
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus
 45
 <400> 5
 Arg Met Trp Tyr Asp Gly Asp Thr Val
 1 5

 <210> 6
 <211> 13
 50 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

 <400> 6
 Asp Phe Gly Tyr Phe Asp Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr
 1 5 10
 55
 <210> 7
 <211> 173

ES 2 629 348 T3

<212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 7

Met Ala Arg Val Phe Gln Gln Asp Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro
 1 5 10 15

Ala Thr Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Leu Ser Cys Arg
 20 25 30

Ala Ser Gln Gly Ile Ser Thr Ser Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser
 35 40 45

Asn Glu Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Phe Ala Ser Gln Ser Ile Ser
 50 55 60

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 65 70 75 80

Leu Ser Ile Asn Arg Val Glu Ser Glu Asp Phe Ser Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Gln Gln Thr Tyr Ser Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 100 105 110

Glu Leu Lys Arg Ala Asp Gly Cys Thr Asn Cys Ile His Leu Ser Arg
 115 120 125

Arg Ser Pro Thr Ile Phe Ser Ala Ala Met Glu Asn Arg Cys Ser Ser
 130 135 140

Phe Ile Leu Ser Arg Phe Ser Gly Cys Ile Leu Lys Leu Ile Leu Arg
 145 150 155 160

5 Thr Met Leu Thr Thr Ser Ser Gly Thr Val Val Gly Gly
 165 170

<210> 8
 <211> 197
 <212> PRT
 10 <213> Rattus norvegicus

<400> 8

ES 2 629 348 T3

Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 20 25 30
 Ser Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Pro Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Met Trp Tyr Asp Gly Asp Thr Val Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Phe Leu
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Glu Thr Asp Glu Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95
 Arg Asp Phe Gly Tyr Phe Asp Gly Ser Ser Pro Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser Ala Glu Thr Thr Ala Pro Ser
 115 120 125
 Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Thr Ala Leu Lys Ser Asn Ser Met Val
 130 135 140
 Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Ile Leu Leu Lys Asn Ser Ser His Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Leu Ala Ala Ala Leu Pro Ile Val Ser Arg Ile Thr Pro Asp
 165 170 175
 Gly Tyr Gly Val Gln Ala Gln Val Leu Lys Gln Leu Ile Leu Phe Thr
 180 185 190
 Met Arg Lys Lys Gln
 195

<210> 9
 <211> 33
 5 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

<400> 9
 agggccagtc aggggtattag cactagcata cac

33

10 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Rattus norvegicus

ES 2 629 348 T3

	<400> 10		
	tttgattccc agtccatctc t		21
5	<210> 11 <211> 30 <212> ADN <213> Rattus norvegicus		
10	<400> 11		
	caacagactt acagcttgcc ctacacgttt		30
15	<210> 12 <211> 519 <212> ADN <213> Rattus norvegicus		
	<400> 12		
	atggctcgag ttttccagca agatgatatt gtgatgacct agactccagc caccctgtct		60
	gtgactccag gagagagtgt cagtctctcc tgcagggcca gtcaggggat tagcactagc		120
	atacactggg atcagcaaaa atcaaagatg tctccaaggc ttctcatcaa atttgcttcc		180
	cagtccatct ctggaatccc ctccaggttc agtggcagtg gatcagggac agatttcact		240
	ctcagtatca acagagtaga atctgaagat ttttcagttt atttctgtca acagacttac		300
	agcttgcctt acacgtttgg agctgggacc aagctggaac tgaaacgggc tgatggctgc		360
	accaactgta tccatctttc tagaagatct cctacaatat tctcagctgc catggaaaat		420
	cgatgttctt cttttattct ctcaagattt tcaggctgta tattaaaact tatattaaga		480
	actatgctaa ccacctcatc aggaaccggt gtaggtggc		519
20	<210> 13 <211> 30 <212> ADN <213> Rattus norvegicus		
25	<400> 13		
	gggttctcac taaccaccta tagtgtaagt		30
30	<210> 14 <211> 27 <212> ADN <213> Rattus norvegicus		
35	<400> 14		
	agaatgtggg atgatggaga cacagtg		27
40	<210> 15 <211> 39 <212> ADN <213> Rattus norvegicus		
	<400> 15		
	gatttcggat actttgatgg tagttcccc tttgattac		39
45	<210> 16 <211> 592 <212> ADN		

ES 2 629 348 T3

<213> Rattus norvegicus

<400> 16

```

gaggtaaagc tggaggagtc aggacctggt ctgggtgcagc cctcagagac cctgtccctc      60
acctgcactg tctctggggt ctactaacc acctatagtg taagttgggt tcgccagcct      120
tcaggaaaag gtctcgagtg gatgggaaga atgtggtatg atggagacac agtgtataat      180
tcagctctca aatcccgact gagcatcagc agggacacct ccaagaacca agttttctta      240
aaaatgaaca gtctggaaac tgatgaaaca ggcacttact actgtaccag agatttcgga      300
tactttgatg gtagttcccc ctttgattac tggggccaag gagtcatggt cacagtctcc      360
tcagctgaaa caacagcccc atctgtctat ccaactggctc ctggaactgc tctcaaaagt      420
aactccatgg tgaccctggg atgcctggtc aagatcttgc tgaaaaactc gagccatccg      480
gaagatctgg cggccgctct ccctatagtg agtcgtatta cgccgatgg atatggtgtt      540
caggcacaag tgttaaagca gttgatttta ttcactatga gaaaaaaca at      592

```

5

<210> 17

<211> 354

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 17

```

Met Pro Arg Arg Ser Leu His Ala Ala Ala Val Leu Leu Leu Val Ile
1           5           10           15

Leu Lys Glu Gln Pro Ser Ser Pro Ala Pro Val Asn Gly Ser Lys Trp
          20           25           30

Thr Tyr Phe Gly Pro Asp Gly Glu Asn Ser Trp Ser Lys Lys Tyr Pro
          35           40           45

Ser Cys Gly Gly Leu Leu Gln Ser Pro Ile Asp Leu His Ser Asp Ile
          50           55           60

Leu Gln Tyr Asp Ala Ser Leu Thr Pro Leu Glu Phe Gln Gly Tyr Asn
65           70           75           80

```

ES 2 629 348 T3

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

ES 2 629 348 T3

340

345

350

His Ala

<210> 18
 <211> 1065
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18
 atgccccggc gcagcctgca cgcgggcggcc gtgctcctgc tggatgatctt aaaggaacag 60
 ccttccagcc cggccccagt gaacggttcc aagtggactt attttgggtcc tgatggggag 120
 aatagctggc ccaagaagta cccgtcgtgt gggggcctgc tgcagtcccc catagacctg 180
 cacagtgaca tcctccagta tgacgccagc ctcacgcccc tcgagttcca aggctacaat 240
 ctgtctgcc acaagcagtt tctcctgacc aacaatggcc attcagtgaa gctgaacctg 300
 ccctcggaca tgcacatcca gggcctccag tctcgttaca gtgccacgca gctgcacctg 360
 cactggggga acccgaatga cccgcacggc tctgagcaca ccgtcagcgg acagcacttc 420
 gccgccgagc tgcacattgt ccattataac tcagacctt atcctgacgc cagcactgcc 480
 agcaacaagt cagaaggcct cgctgtcctg gctgttctca ttgagatggg ctccttcaat 540
 ccgtcctatg acaagatctt cagtcacctt caacatgtaa agtaciaaagg ccaggaagca 600
 ttcgtcccgg gattcaacat tgaagagctg cttccggaga ggaccgctga atattaccgc 660
 taccgggggt ccctgaccac acccccttgc aaccctactg tgctctggac agttttccga 720
 aaccctcgtc aaatttccca ggagcagctg ctggctttgg agacagccct gtactgcaca 780
 cacatggacg acccttcccc cagagaaatg atcaacaact tccggcaggt ccagaagtcc 840
 gatgagaggc tggatatacac ctcttctcc caagtgcaag tctgtactgc ggcaggactg 900
 agtctgggca tcatcctctc actggcctg gctggcattc ttggcatctg tattgtgggtg 960
 gtggtgtcca tttggctttt cagaaggaag agtatcaaaa aaggatgataa caagggagtc 1020
 attacaagc cagccacca a gatggagact gaggcccacg cttga 1065

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que se une a anhidrasa carbónica XII, en donde el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 1 (CDR1), 2 (CDR2) y 3 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_H, y las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO 4 (CDR1), 5 (CDR2) y 6 (CDR3) que determinan las CDR de la región V_L.
- 10 2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo comprende la región V_H determinada por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 7 y la región V_L determinada por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 8.
- 15 3. El anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en donde dicho anticuerpo está acoplado a
 - (a) un grupo marcador
 - (b) una toxina, o
 - (c) un fármaco antitumoral.
- 20 4. Una molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 5 5. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 4 en una forma expresable.
- 25 6. Un huésped no humano que comprende el vector de la reivindicación 5.
7. Un método para producir un anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende
 - (a) cultivar el huésped de la reivindicación 6 en condiciones que permitan la síntesis de dicho anticuerpo; y
 - (b) recuperar dicho anticuerpo de dicho cultivo.
- 30 8. Una composición diagnóstica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
9. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
- 35 10. El anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para uso en tratar o inhibir hipoxia, un tumor sólido o una enfermedad ocular.
- 40 11. El anticuerpo para uso según la reivindicación 10, en donde dicha hipoxia se selecciona de hipoxia tumoral, hipoxia neuronal, hipoxia cerebral, estenosis e isquemia.
12. El anticuerpo para uso según la reivindicación 10, en donde el tumor sólido se selecciona de sarcomas, glioma, carcinoma, mesotelioma, linfoma, tumor de riñón, tumor pulmonar, tumor mamario, tumor cervical, tumor ovárico, tumor colorrectal, tumor hepático, tumor de próstata, tumor de páncreas y tumor de cabeza y cuello.
- 45 13. El anticuerpo para uso según la reivindicación 10, en donde dicha enfermedad ocular se selecciona de hipertensión ocular, glaucoma, degeneración macular, degeneración macular senil, uveítis, retinitis, retinosquiasis ligada a X y retinopatía hipertensa.

Figura 1:

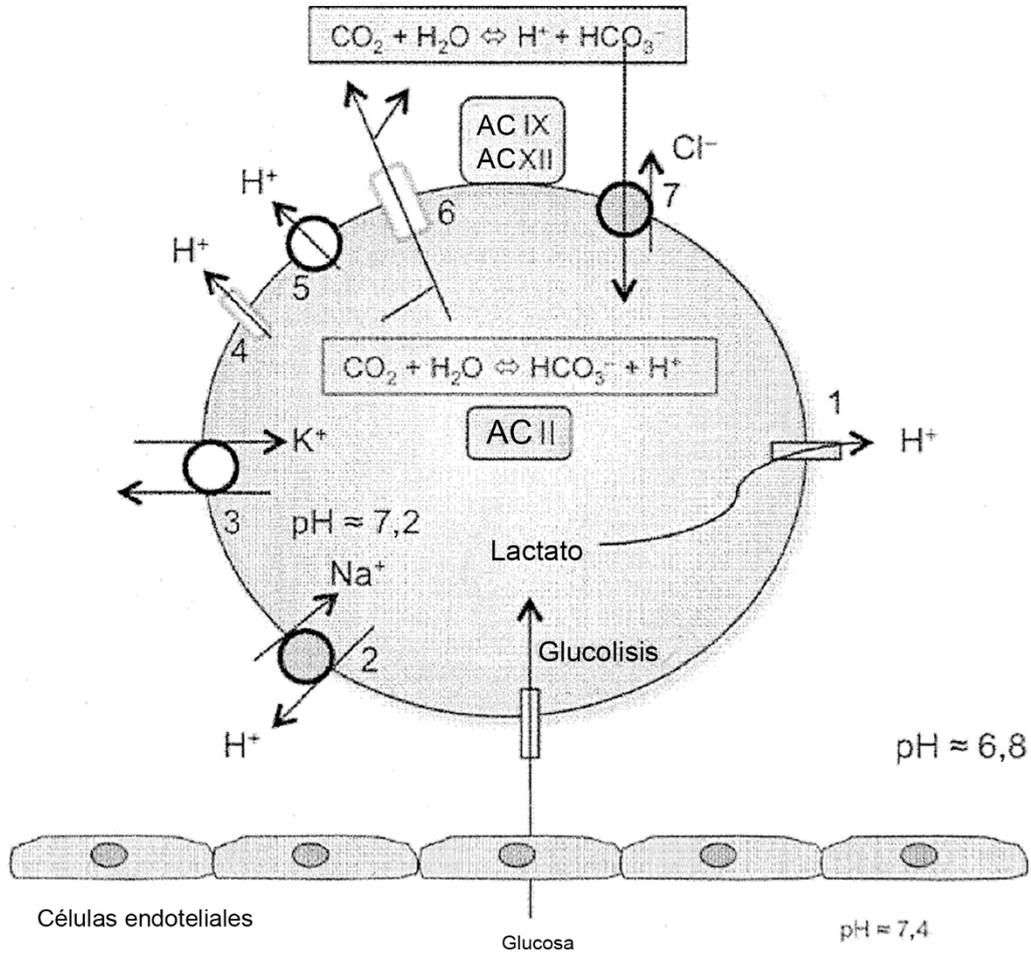


Figura 2:

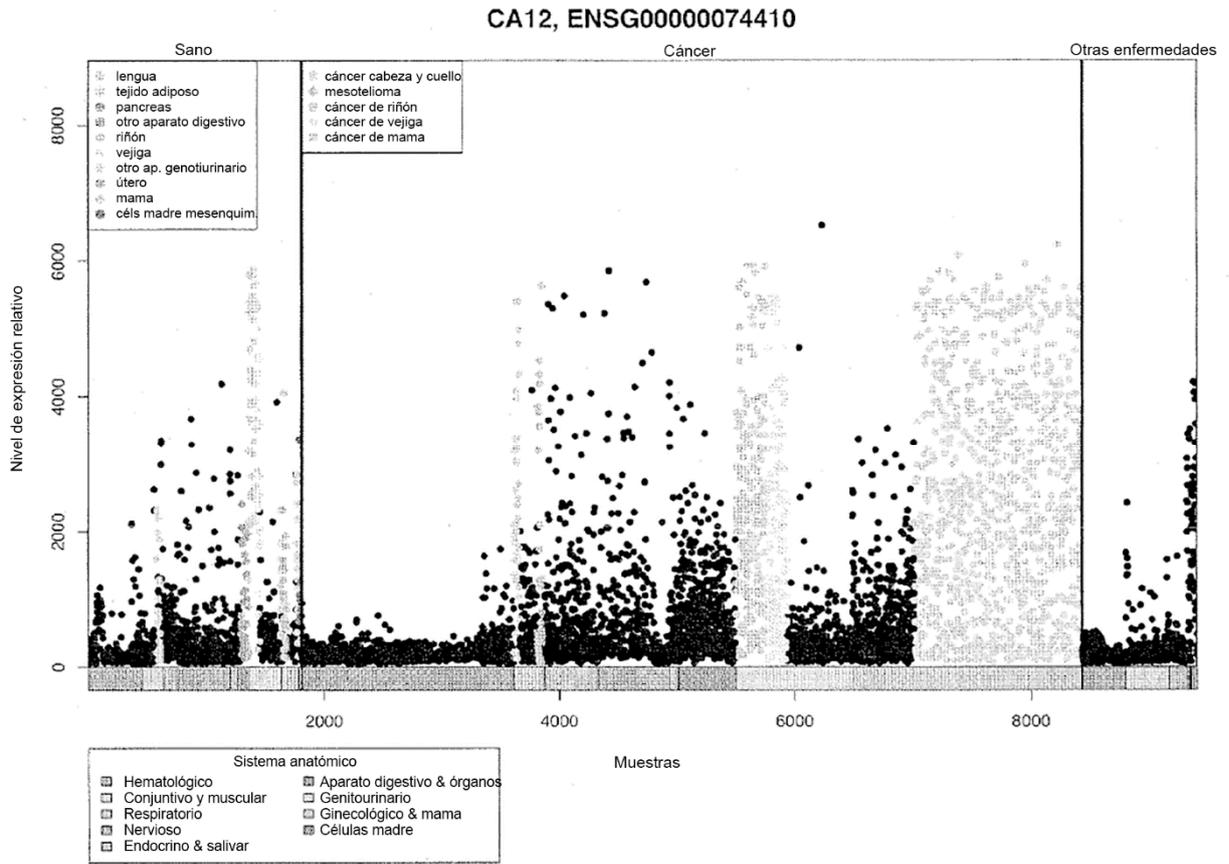


Figura 3:

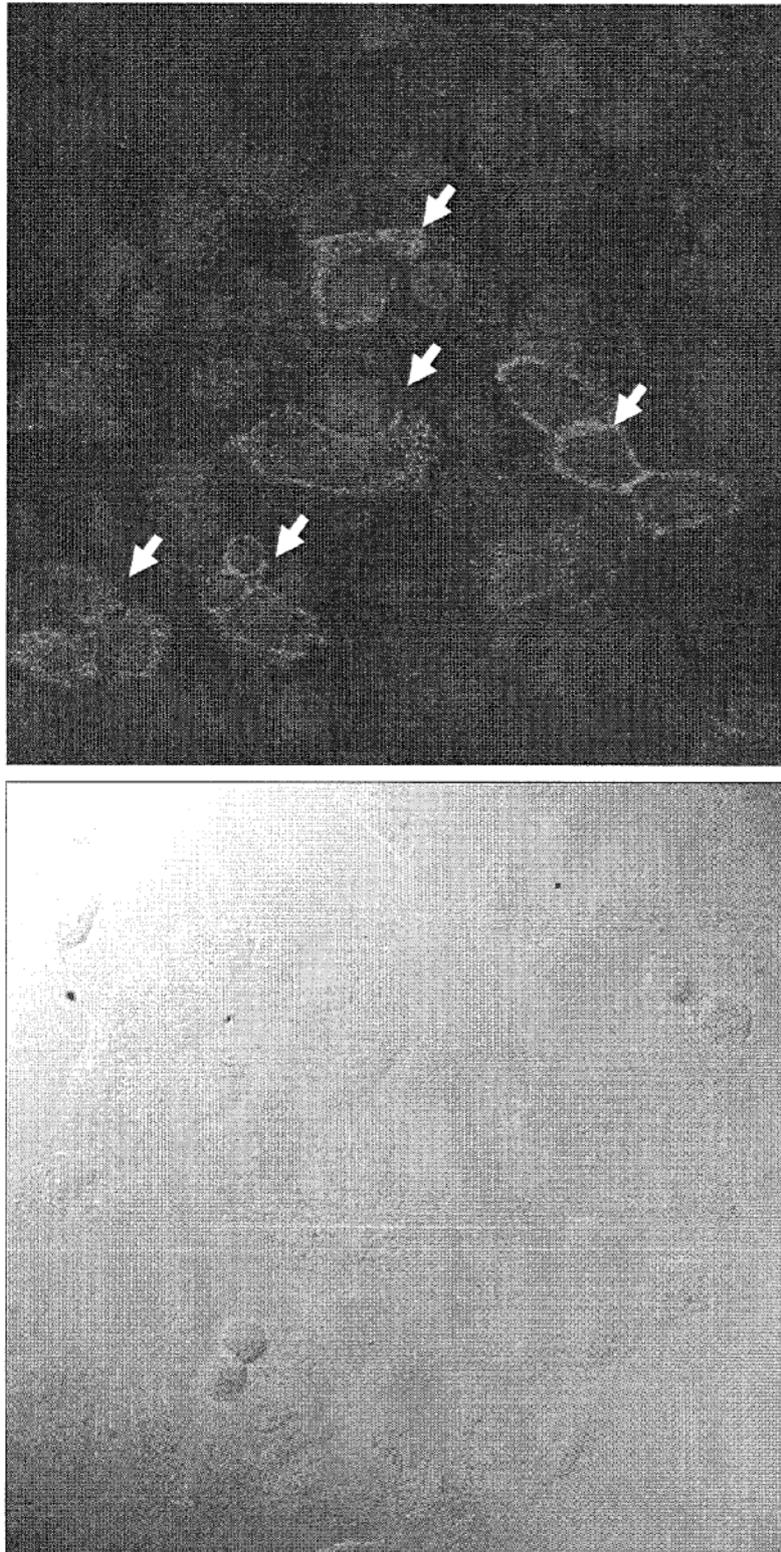


Figura 4:

A

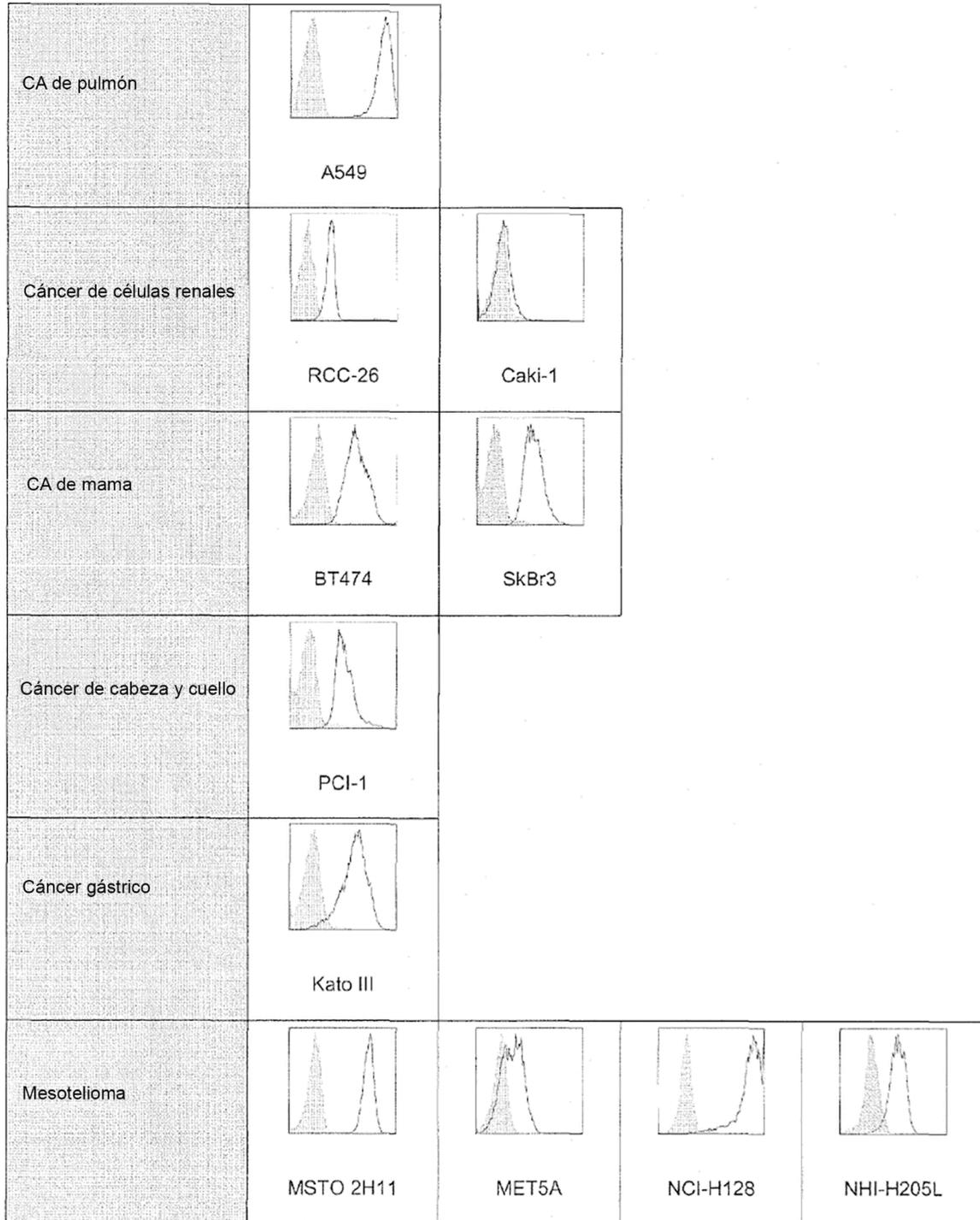
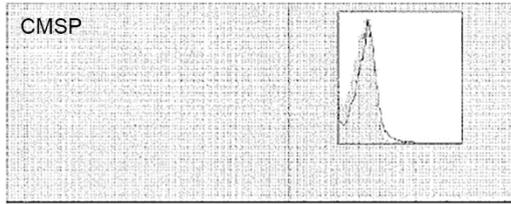
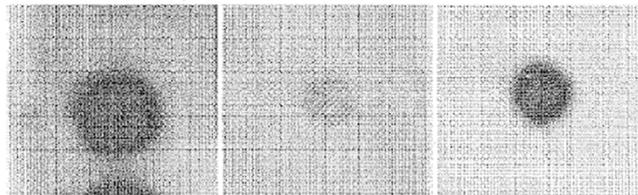


Figura 4A (continuada):



B



GM1

Iso

6A10

Figura 5:

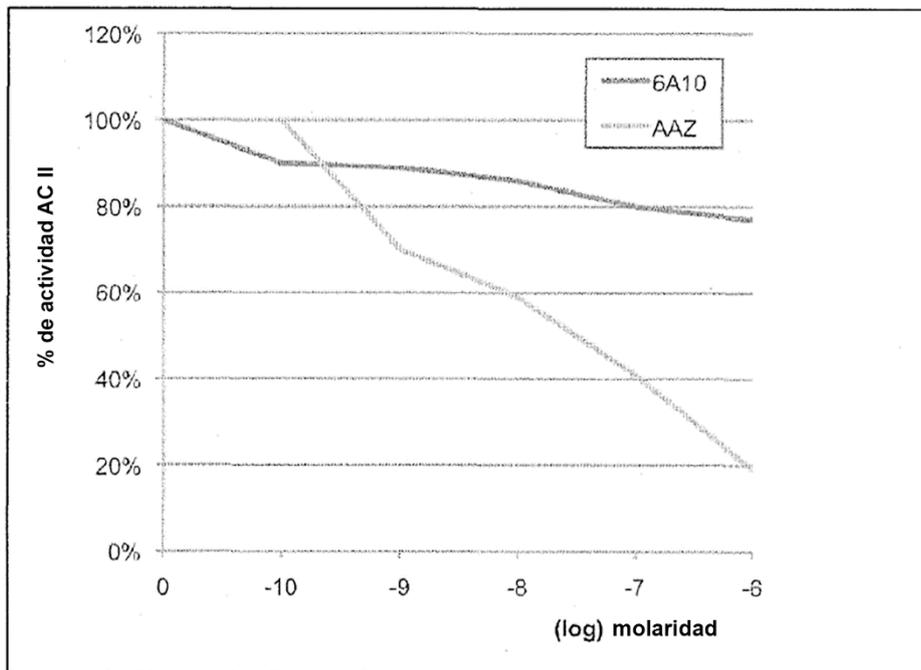
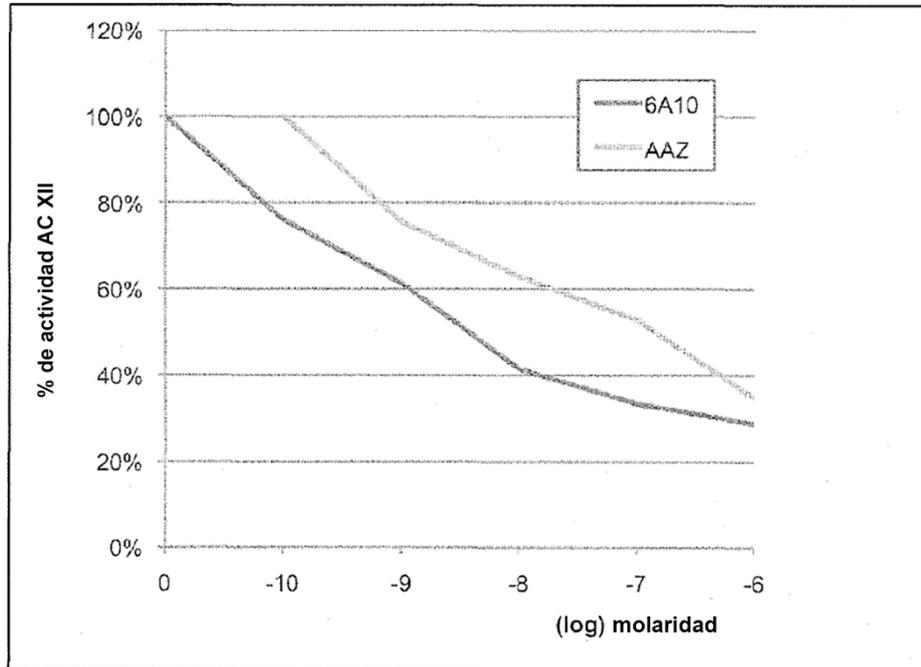


Figura 6:

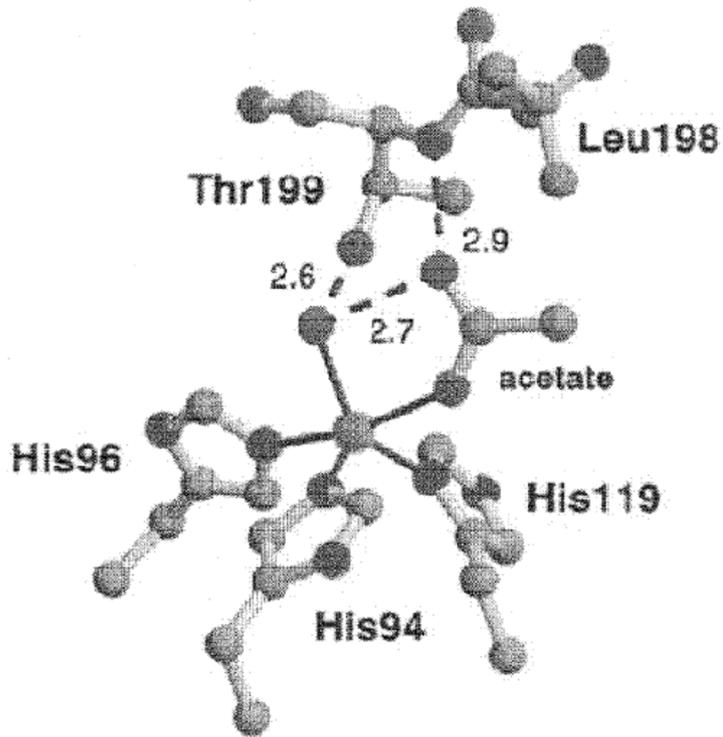


Figura 7:

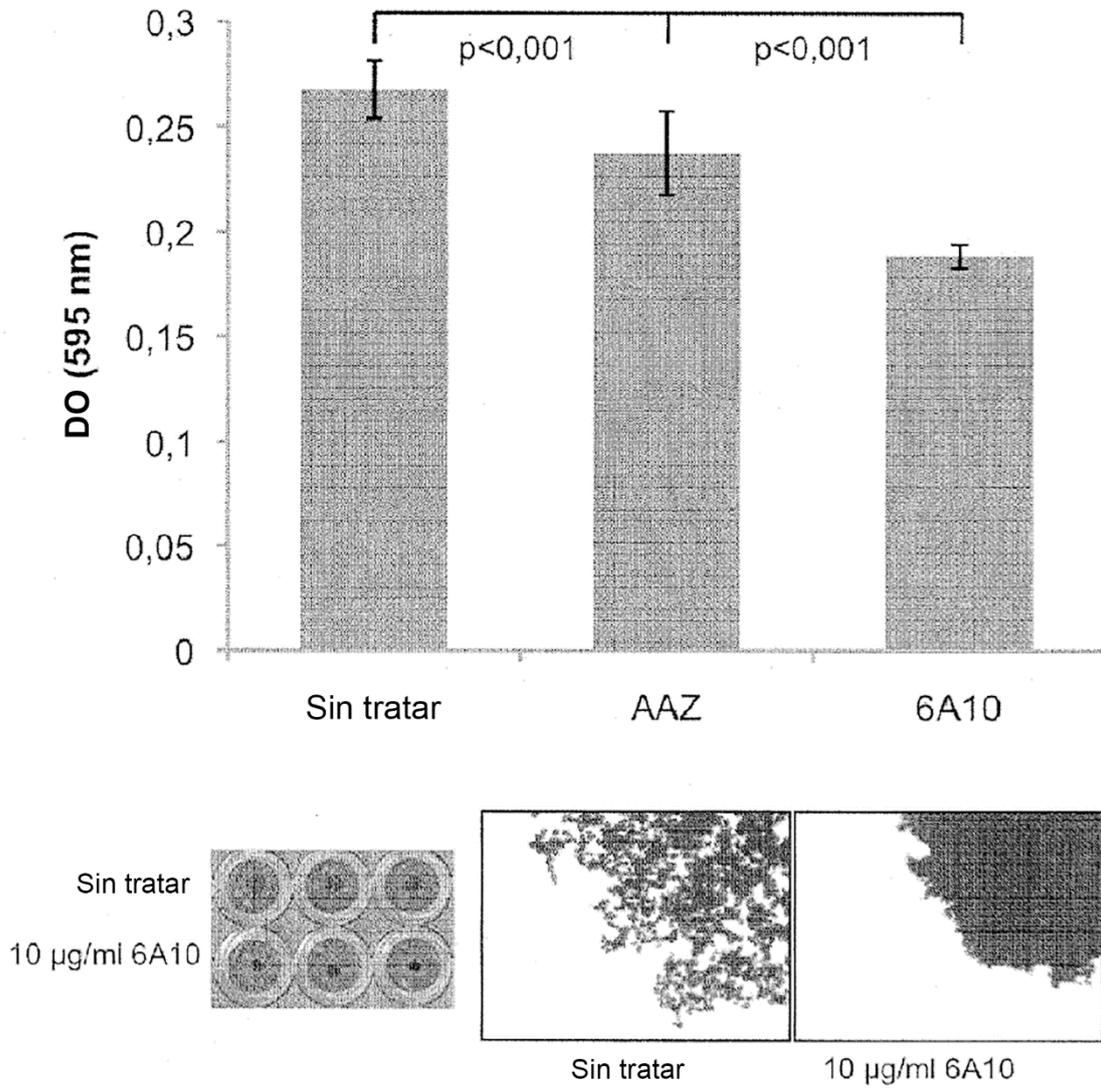


Figura 8:

```

ATG GCT CGA GTT TTT CAG CAA GAT GAT ATT GTG ATG ACC CAG ACT CCA
TAC CGA GCT CAA AAA GTC GTT CTA CTA TAA CAC TAC TGG GTC TGA GGT
M A R V F Q Q D D I V M T Q T P>

GCC ACC CTG TCT GTG ACT CCA GGA GAG AGT GTC AGT CTC TCC TGC AGG
CGG TGG GAC AGA CAC TGA GGT CCT CTC TCA CAG TCA GAG AGG ACG TCC
A T L S V T P G E S V S L S C R>

GCC AGT CAG GGT ATT AGC ACT AGC ATA CAC TGG TAT CAG CAA AAA TCA
CGG TCA GTC CCA TAA TCG TGA TCG TAT GTG ACC ATA GTC GTT TTT AGT
A S Q G I S T S I H W Y Q Q K S>

AAT GAG TCT CCA AGG CTT CTC ATC AAA TTT GCT TCC CAG TCC ATC TCT
TTA CTC AGA GGT TCC GAA GAG TAG TTT AAA CGA AGG GTC AGG TAG AGA
N E S P R L L I K F A S Q S I S>

GGA ATC CCC TCC AGG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACT
CCT TAG GGG AGG TCC AAG TCA CCG TCA CCT AGT CCC TGT CTA AAG TGA
G I P S R F S G S G S G T D F T>

CTC AGT ATC AAC AGA GTA GAA TCT GAA GAT TTT TCA GTT TAT TTC TGT
GAG TCA TAG TTG TCT CAT CTT AGA CTT CTA AAA AGT CAA ATA AAG ACA
L S I N R V E S E D F S V Y F C>

CAA CAG ACT TAC AGC TTG CCC TAC ACG TTT GGA GCT GGG ACC AAG CTG
GTT GTC TGA ATG TCG AAC GGG ATG TGC AAA CCT CGA CCC TGG TTC GAC
Q Q T Y S L P Y T F G A G T K L>

GAA CTG AAA CGG GCT GAT GGC TGC ACC AAC TGT ATC CAT CTT TCT AGA
CTT GAC TTT GCC CGA CTA CCG ACG TGG TTG ACA TAG GTA GAA AGA TCT
E L K R A D G C T N C I H L S R>

AGA TCT CCT ACA ATA TTC TCA GCT GCC ATG GAA AAT CGA TGT TCT TCT
TCT AGA GGA TGT TAT AAG AGT CGA CGG TAC CTT TTA GCT ACA AGA AGA
R S P T I F S A A M E N R C S S>

TTT ATT CTC TCA AGA TTT TCA GGC TGT ATA TTA AAA CTT ATA TTA AGA
AAA TAA GAG AGT TCT AAA AGT CCG ACA TAT AAT TTT GAA TAT AAT TCT
F I L S R F S G C I L K L I L R>

ACT ATG CTA ACC ACC TCA TCA GGA ACC GTT GTA GGT GGC
TGA TAC GAT TGG TGG AGT AGT CCT TGG CAA CAT CCA CCG
T M L T T S S G T V V G G>

```

Figura 9:

GAG	GTA	AAG	CTG	GAG	GAG	TCA	GGA	CCT	GGT	CTG	GTG	CAG	CCC	TCA	GAG
CTC	CAT	TTC	GAC	CTC	CTC	AGT	CCT	GGA	CCA	GAC	CAC	GTC	GGG	AGT	CTC
E	V	K	L	E	E	S	G	P	G	L	V	Q	P	S	E>
ACC	CTG	TCC	CTC	ACC	TGC	ACT	GTC	TCT	GGG	TTC	TCA	CTA	ACC	ACC	TAT
TGG	GAC	AGG	GAG	TGG	ACG	TGA	CAG	AGA	CCC	AAG	AGT	GAT	TGG	TGG	ATA
T	L	S	L	T	C	T	V	S	<u>G</u>	<u>F</u>	<u>S</u>	<u>L</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>Y</u> >
AGT	GTA	AGT	TGG	GTT	CGC	CAG	CCT	TCA	GGA	AAA	GGT	CCT	GAG	TGG	ATG
TCA	CAT	TCA	ACC	CAA	GCG	GTC	GGA	AGT	CCT	TTT	CCA	GGA	CTC	ACC	TAC
<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	W	V	R	Q	P	S	G	K	G	P	E	W	M>
GGA	AGA	ATG	TGG	TAT	GAT	GGA	GAC	ACA	GTG	TAT	AAT	TCA	GCT	CTC	AAA
CCT	TCT	TAC	ACC	ATA	CTA	CCT	CTG	TGT	CAC	ATA	TTA	AGT	CGA	GAG	TTT
G	<u>R</u>	<u>M</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>T</u>	<u>V</u>	Y	N	S	A	L	K>
TCC	CGA	CTG	AGC	ATC	AGC	AGG	GAC	ACC	TCC	AAG	AAC	CAA	GTT	TTC	TTA
AGG	GCT	GAC	TCG	TAG	TCG	TCC	CTG	TGG	AGG	TTC	TTG	GTT	CAA	AAG	AAT
S	R	L	S	I	S	R	D	T	S	K	N	Q	V	F	L>
AAA	ATG	AAC	AGT	CTG	GAA	ACT	GAT	GAA	ACA	GGC	ACT	TAC	TAC	TGT	ACC
TTT	TAC	TTG	TCA	GAC	CTT	TGA	CTA	CTT	TGT	CCG	TGA	ATG	ATG	ACA	TGG
K	M	N	S	L	E	T	D	E	T	G	T	Y	Y	C	T>
AGA	GAT	TTC	GGA	TAC	TTT	GAT	GGT	AGT	TCC	CCC	TTT	GAT	TAC	TGG	GGC
TCT	CTA	AAG	CCT	ATG	AAA	CTA	CCA	TCA	AGG	GGG	AAA	CTA	ATG	ACC	CCG
R	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>F</u>	<u>D</u>	<u>Y</u>	W	G>
CAA	GGA	GTC	ATG	GTC	ACA	GTC	TCC	TCA	GCT	GAA	ACA	ACA	GCC	CCA	TCT
GTT	CCT	CAG	TAC	CAG	TGT	CAG	AGG	AGT	CGA	CTT	TGT	TGT	CGG	GGT	AGA
Q	G	V	M	V	T	V	S	S	A	E	T	T	A	P	S>
GTC	TAT	CCA	CTG	GCT	CCT	GGA	ACT	GCT	CTC	AAA	AGT	AAC	TCC	ATG	GTG
CAG	ATA	GGT	GAC	CGA	GGA	CCT	TGA	CGA	GAG	TTT	TCA	TTG	AGG	TAC	CAC
V	Y	P	L	A	P	G	T	A	L	K	S	N	S	M	V>
ACC	CTG	GGA	TGC	CTG	GTC	AAG	ATC	TTG	CTG	AAA	AAC	TCG	AGC	CAT	CCG
TGG	GAC	CCT	ACG	GAC	CAG	TTC	TAG	AAC	GAC	TTT	TTG	AGC	TCG	GTA	GGC
T	L	G	C	L	V	K	I	L	L	K	N	S	S	H	P>
GAA	GAT	CTG	GCG	GCC	GCT	CTC	CCT	ATA	GTG	AGT	CGT	ATT	ACG	CCG	GAT
CTT	CTA	GAC	CGC	CGG	CGA	GAG	GGA	TAT	CAC	TCA	GCA	TAA	TGC	GGC	CTA
E	D	L	A	A	A	L	P	I	V	S	R	I	T	P	D>

Figura 9 (continuada):

```

GGA TAT GGT GTT CAG GCA CAA GTG TTA AAG CAG TTG ATT TTA TTC ACT
CCT ATA CCA CAA GTC CGT GTT CAC AAT TTC GTC AAC TAA AAT AAG TGA
G   Y   G   V   Q   A   Q   V   L   K   Q   L   I   L   F   T>

ATG AGA AAA AAA CAA T
TAC TCT TTT TTT GTT A
M   R   K   K   Q>
    
```

Figura 10:

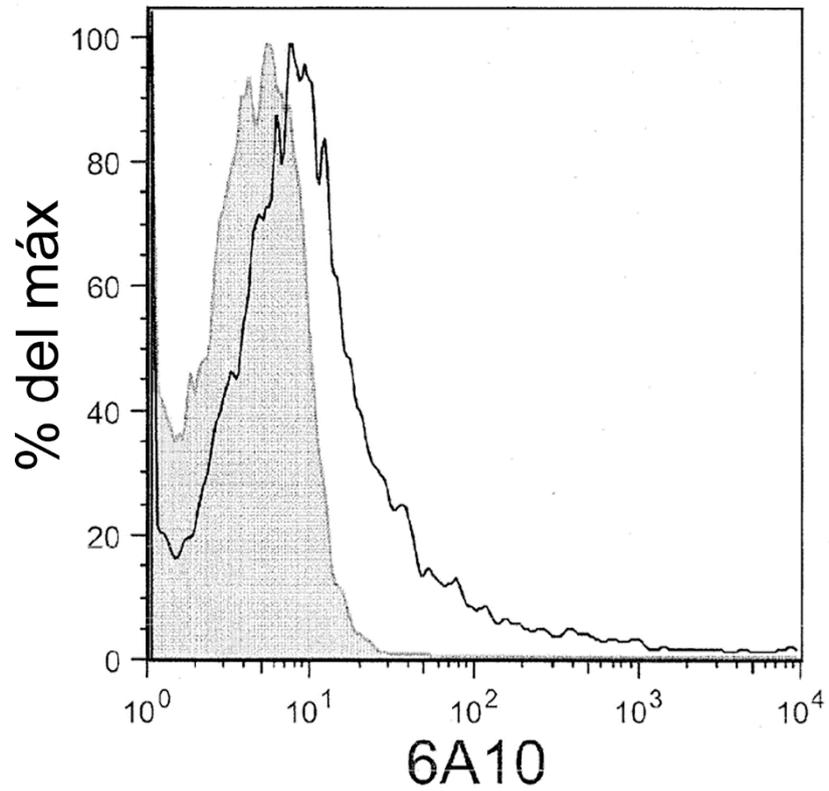


Figura 11:

MPRRSLHAAAVLLLVLKEQPSSPAPVNGSKWTYFGPDGENSWSKKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDA
SLTPLEFQGYNLSANKQFLLTNNGHVSVKLNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPNDPHGSEHTVS
GQHFAAELHIVHYNSDLYPDASTASNKSEGLAVLAVLIEMGSFNPSYDKIFSHLQHVYKYGQEAFFVPGFN
IEELLPERTAEYYRYRGSLLTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYCTHMDDPSPREMINNFR
QVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLSLGIILSLALAGILGICIVVVSIWLFRRRSIKKGDNKGVIYKPATK
METEAHA*

(No. registro NM_001218)

MPRRSLHAAAVLLLVLKEQPSSPAPVNGSKWTYFGPDGENSWSKKYPSCGGLLQSPIDLHSDILQYDA
SLTPLEFQGYNLSANKQFLLTNNGHVSVKLNLPSDMHIQGLQSRYSATQLHLHWGNPNDPHGSEHTVS
GQHFAAELHIVHYNSDLYPDASTASNKSEGLAVLAVLIEMGSFNPSYDKIFSHLQHVYKYGQEAFFVPGFN
IEELLPERTAEYYRYRGSLLTPPCNPTVLWTVFRNPVQISQEQLLALETALYCTHMDDPSPREMINNFR
QVQKFDERLVYTSFSQVQVCTAAGLSLGIILSLALAGILGICIVVVSIWLFRRRSIKKGDNKGVIYKPATK
METEAHA

Figura 12:

ATGCCCCGGCGCAGCCTGCACGGCGGGCCGTGCTCCTGCTGGTGATCTTAAAGGAACAGCCTT
CCAGCCCCGGCCCCAGTGAACGGTTCCAAGTGGACTTATTTTGGTCCTGATGGGGAGAATAGCTGG
TCCAAGAAGTACCCGTCGTGTGGGGGCCTGCTGCAGTCCCCATAGACCTGCACAGTGACATCCT
CCAGTATGACGCCAGCCTCACGCCCCTCGAGTTCCAAGGCTACAATCTGTCTGCCAACAAAGCAGT
TTCTCCTGACCAACAATGGCCATTCAGTGAAGCTGAACCTGCCCTCGGACATGCACATCCAGGGC
CTCCAGTCTCGCTACAGTGCCACGCAGCTGCACCTGCACTGGGGGAACCCGAATGACCCGCACG
GCTCTGAGCACACCGTCAGCGGACAGCACTTCGCCGCCGAGCTGCACATTGTCCATTATAACTCA
GACCTTTATCCTGACGCCAGCACTGCCAGCAACAAGTCAGAAGGCCTCGCTGTCTGGCTGTTCT
CATTGAGATGGGCTCCTTCAATCCGTCCATGACAAGATCTTCAGTCACCTTCAACATGTAAAGTA
CAAAGGCCAGGAAGCATTTCGTCCCAGGATTCAACATTGAAGAGCTGCTTCCGGAGAGGACCGCTG
AATATTACCGCTACCGGGGGTCCCTGACCACACCCCTTGAACCCCACTGTGCTCTGGACAGTT
TTCCGAAACCCCGTGCAAATTTCCAGGAGCAGCTGCTGGCTTTGGAGACAGCCCTGTACTGCAC
ACACATGGACGACCCTTCCCCCAGAGAAATGATCAACAACCTCCGGCAGGTCCAGAAGTTCGATG
AGAGGCTGGTATACACCTCCTTCTCCAAGTGAAGTCTGTACTGCGGCAGGACTGAGTCTGGGC
ATCATCCTCTCACTGGCCCTGGCTGGCATTCTTGGCATCTGTATTGTGGTGGTGGTGTCCATTTG
GCTTTTCAGAAGGAAGAGTATCAAAAAAGGTGATAACAAGGGAGTCATTTACAAGCCAGCCACCAA
GATGGAGACTGAGGCCACGCTTGA

(No. de registro NM_001218)

ATGCCCCGGCGCAGCCTGCACGGCGGGCCGTGCTCCTGCTGGTGATCTTAAAGGAACAGCCTT
CCAGCCCCGGCCCCAGTGAACGGTTCCAAGTGGACTTATTTTGGTCCTGATGGGGAGAATAGCTGG
TCCAAGAAGTACCCGTCGTGTGGGGGCCTGCTGCAGTCCCCATAGACCTGCACAGTGACATCCT
CCAGTATGACGCCAGCCTCACGCCCCTCGAGTTCCAAGGCTACAATCTGTCTGCCAACAAAGCAGT
TTCTCCTGACCAACAATGGCCATTCAGTGAAGCTGAACCTGCCCTCGGACATGCACATCCAGGGC
CTCCAGTCTCGCTACAGTGCCACGCAGCTGCACCTGCACTGGGGGAACCCGAATGACCCGCACG
GCTCTGAGCACACCGTCAGCGGACAGCACTTCGCCGCCGAGCTGCACATTGTCCATTATAACTCA
GACCTTTATCCTGACGCCAGCACTGCCAGCAACAAGTCAGAAGGCCTCGCTGTCTGGCTGTTCT
CATTGAGATGGGCTCCTTCAATCCGTCCATGACAAGATCTTCAGTCACCTTCAACATGTAAAGTA
CAAAGGCCAGGAAGCATTTCGTCCCAGGATTCAACATTGAAGAGCTGCTTCCGGAGAGGACCGCTG
AATATTACCGCTACCGGGGGTCCCTGACCACACCCCTTGAACCCCACTGTGCTCTGGACAGTT
TTCCGAAACCCCGTGCAAATTTCCAGGAGCAGCTGCTGGCTTTGGAGACAGCCCTGTACTGCAC
ACACATGGACGACCCTTCCCCCAGAGAAATGATCAACAACCTCCGGCAGGTCCAGAAGTTCGATG
AGAGGCTGGTATACACCTCCTTCTCCAAGTGAAGTCTGTACTGCGGCAGGACTGAGTCTGGGC
ATCATCCTCTCACTGGCCCTGGCTGGCATTCTTGGCATCTGTATTGTGGTGGTGGTGTCCATTTG
GCTTTTCAGAAGGAAGAGTATCAAAAAAGGTGATAACAAGGGAGTCATTTACAAGCCAGCCACCAA
GATGGAGACTGAGGCCACGCTTGA

Figura 13:

