

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 333**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/18** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.12.2013 PCT/US2013/078290**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2014 WO14106176**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.12.2013 E 13869692 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.02.2018 EP 2938633**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales humanizados y métodos de uso para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de colon y páncreas**

30 Prioridad:

**28.12.2012 US 201261747067 P**

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

**10.05.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**WANG, XUE-PING y  
ARLEN, PHILIP, M.**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 667 333 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Anticuerpos monoclonales humanizados y métodos de uso para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de colon y páncreas

5 La invención se refiere a anticuerpos que se unen a un antígeno A33.

**Antecedentes**

10 El cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal son los tres cánceres más comunes entre los hombres. El cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, el cáncer de hígado, y el cáncer colorrectal son las causas conducentes a las muertes por cáncer entre hombres. El cáncer de mama, el cáncer de pulmón, y el cáncer colorrectal son los tres cánceres más comunes entre mujeres. El cáncer de pulmón, el cáncer de mama, y el cáncer colorrectal son las causas conducentes a la muerte por cáncer entre mujeres. Como ejemplo, solo cada año en los  
15 Estados Unidos, se diagnostican más de 43.000 personas con cáncer de páncreas. Aunque ha habido muchos avances en la detección y el tratamiento del cáncer durante las dos últimas décadas, las opciones actuales para la detección y el tratamiento temprano del cáncer son limitadas.

20 A pesar de los avances médicos en la detección del cáncer y la supervivencia, existe una necesidad de estrategias de detección y regímenes de tratamiento tempranos para reducir la morbilidad y la mortalidad del cáncer. Los anticuerpos monoclonales han demostrado ser eficaces en la mejora de los tratamientos contra el cáncer como se evidenció por la homologación de la U.S. Food and Drug Administration (FDA) de dichos agentes como ARZERRA® (ofatumumab), AVASTIN® (bevacizumab), BEXXAR® (tositumomab), CAMPATH® (alemtuzumab), ERBITUX® (cetuximab), HERCEPTIN® (trastuzumab), RITUXAN® (rituximab), VECTIBIX® (panitumumab), y ZEVALIN® (ibritumomab). Otros muchos anticuerpos monoclonales están actualmente en ensayos clínicos como monoterapia o  
25 en combinación con otras terapias, mostrando resultados prometedores para el tratamiento del cáncer.

30 El documento WO 2006/004950 A2 divulga el anticuerpo monoclonal humanizado 31.1 como un agente anticanceroso.

El documento US 2008/0200654 A1 divulga un anticuerpo dirigido contra A33.

**Sumario**

35 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanizados 31.1 (anticuerpos NEO-300). Estos anticuerpos monoclonales humanizados 31.1 (anticuerpos NEO-300) pueden utilizarse en métodos para detectar y tratar el cáncer.

40 En una realización, un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede comprender al menos una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, 75, 76, o 77 o una de las regiones variables contenidas en la anterior.

45 En una realización, un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83.

50 En una realización, un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede comprender al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, 87 o una de las regiones variables contenidas en la anterior.

En una realización, un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93.

55 Por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:84; o puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:85; o puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y la  
60 secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:86; o puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:87.

65 En otra realización, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de la CDR1 de SEQ ID NO:78, la secuencia de aminoácidos de la CDR2 de SEQ ID NO:79, 80, 81, u 82 y la secuencia de aminoácidos de la CDR3 de SEQ ID NO:83.







- En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo abb31.1-HC (SEQ ID NO:75) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo ven31.1-LC (SEQ ID NO:87).
- 5 En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo sdr31.1-HC (SEQ ID NO:76) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo cdr31.1-LC (SEQ ID NO:84).
- En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo sdr31.1-HC (SEQ ID NO:76) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo abb31.1-LC (SEQ ID NO:85).
- 10 En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo sdr31.1-HC (SEQ ID NO:76) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo sdr31.1-LC (SEQ ID NO:86).
- En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo sdr31.1-HC (SEQ ID NO:76) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo ven31.1-LC (SEQ ID NO:87).
- 15 En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo ven31.1-HC (SEQ ID NO:77) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo cdr31.1-LC (SEQ ID NO:84).
- En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo ven31.1-HC (SEQ ID NO:77) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo abb31.1-LC (SEQ ID NO:85).
- 20 En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo ven31.1-HC (SEQ ID NO:77) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo sdr31.1-LC (SEQ ID NO:86).
- 25 En otra realización, el anticuerpo puede comprender un polipéptido de cadena pesada del anticuerpo ven31.1-HC (SEQ ID NO:77) y un polipéptido de cadena ligera del anticuerpo ven31.1-LC (SEQ ID NO:87).
- En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos una de las mencionadas cadenas pesadas y al menos una de las mencionadas cadenas ligeras. En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos una de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos una de las mencionadas CDR de cadena ligera. En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos dos de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos dos de las mencionadas CDR de cadena ligera. En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos tres de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos tres de las mencionadas CDR de cadena ligera.
- 30 En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, 75, 76, o 77 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; al menos una secuencia de la CDR que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83; al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, 87 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; y/o al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93.
- 35 En otra realización, la cadena pesada puede comprender una CDR1 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, al menos una CDR2 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 79, 80, 81 u 82; y al menos una CDR3 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83.
- 40 En otra realización, la cadena ligera puede comprender al menos una CDR1 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, o 90, al menos una CDR2 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 91 o 92; y una CDR3 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:93.
- 45 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, 11, 12, o 13.
- 50 En una realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser recombinante. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene actividad antitumoral. En otra realización, el fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, CDR, parátipo, o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno.
- 55 En una realización, el anticuerpo puede comprender un dominio constante. El dominio constante puede potenciar una función efectora, tal como ADCC o CDC. Por ejemplo, el dominio constante puede comprender o consistir en dominio constante de IgG1 humana o IgG3 humana. Dicho dominio constante puede modificarse para potenciar una o más funciones efectoras, tal como ADCC o CDC.
- 60 En una realización, el anticuerpo o fragmento puede conjugarse directa o indirectamente a una marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor. En otra realización, el anticuerpo puede premezclarse en una composición con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor.
- 65

En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en combinación con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, de forma simultánea o secuencial.

5 En otra realización, la marca puede ser una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva.

En otra realización, la marca paramagnética puede ser aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio.

10 En otra realización, el agente citotóxico puede ser un resto que inhibe el ADN, ARN, o la síntesis de proteínas, un radionucleido, o una proteína inhibidora de ribosomas.

15 En otra realización, el agente citotóxico puede ser  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica pokeweed, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de la *difteria*, cadena de ricina A, o enzima fosfolipasa citotóxica.

En otra realización, el agente terapéutico puede ser una linfoquina o un factor de crecimiento.

20 En otra realización, el agente inmunosupresor puede ser ciclosporina, leflunomida, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, tacrolimus, o sirolimus.

25 En una realización, la invención proporciona una composición que comprende un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, 75, 76, o 77 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; al menos una secuencia de la CDR que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83; al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, 87 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; y al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93. En otra realización, la cadena pesada puede comprender una CDR1 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, al menos una CDR2 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 79, 80, 81 u 82; y al menos una CDR3 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83. En otra realización, la cadena ligera puede comprender al menos una CDR1 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, o 90, al menos una CDR2 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 91 o 92; y una CDR3 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:93. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, 11, 12, o 13. En otra realización, la composición puede comprender además un transportador farmacéuticamente aceptable.

40 En una realización, un kit diagnóstico puede comprender un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En otra realización, el anticuerpo puede comprender al menos una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, 75, 76, o 77 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; al menos una secuencia de la CDR que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83; al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, 87 o una de las regiones variables contenidas en la anterior; y al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93. En otra realización, la cadena pesada puede comprender una CDR1 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, al menos una CDR2 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 79, 80, 81 u 82; y al menos una CDR3 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83. En otra realización, la cadena ligera puede comprender al menos una CDR1 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, o 90, al menos una CDR2 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 91 o 92; y una CDR3 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:93. En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:10, 11, 12, o 13. En otra realización, el anticuerpo puede fijarse de forma directa o indirecta a un soporte de fase sólida. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una perla, un tubo de ensayo, una lámina, una placa de cultivo, o una tira de ensayo. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una matriz.

60 En una realización, el método para tratar el cáncer puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo a un paciente que lo necesita. En otra realización, el método para retrasar el crecimiento de un tumor puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo a un paciente que lo necesita. En otra realización, el método para destruir células tumorales puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo a un paciente que lo necesita. En otra realización, el método para promover la regresión del tumor puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo a un paciente que lo necesita.

- 5 En una realización, la composición para tratar el cáncer puede comprender un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En otra realización, la composición para retrasar el crecimiento de un tumor puede comprender administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En otra realización, la composición para destruir células tumorales puede comprender una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo. En otra realización, la composición para promover la regresión del tumor en un sujeto puede comprender una cantidad eficaz de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo.
- 10 En una realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer. En otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo en la preparación de un medicamento para retrasar el crecimiento de un tumor. En otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo en la preparación de un medicamento para destruir células tumorales. En otra realización, la invención proporciona el uso de un anticuerpo que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo en la preparación de un medicamento para promover la regresión del tumor.
- 15 En otra realización, el cáncer puede ser de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado. En otra realización, el cáncer puede ser de páncreas o cáncer colorrectal. En otra realización, el anticuerpo puede administrarse en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina, o un factor de crecimiento hematopoyético. En otra realización, el agente puede administrarse de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo. En otra realización, el cáncer puede ser un cáncer en el estadio 1, 2, 3 o 4. En otra realización, el cáncer puede haberse metastatizado. En otra realización, el paciente expresa niveles detectables de un epítipo 31.1. En otra realización, el antígeno tumoral puede detectarse en una muestra de biopsia de un tumor o en la sangre, heces, orina o líquido linfático. En otra realización, el paciente puede estar en riesgo de cáncer. En otra realización, el paciente puede ser un paciente sin síntomas.
- 20 En una realización, el método para detectar un epítipo 31.1 comprende (a) poner en contacto una muestra de ensayo con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, que se une a un epítipo 31.1, y (b) evaluar los complejos anticuerpo-epítipo, donde la presencia de dicho epítipo puede ser indicativa de un carcinoma.
- 25 En una realización, el método para detectar la presencia de un epítipo 31.1 en un paciente comprende (a) administrar a dicho paciente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-24, donde dicho anticuerpo, que se une a un epítipo 31.1 puede estar marcado y (b) detectar la presencia de un epítipo 31.1; donde la presencia de dicho epítipo puede ser indicativa de un carcinoma.
- 30 En otra realización, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo puede estar conjugado a una marca. En otra realización, la marca puede ser una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva. En otra realización, la marca paramagnética puede ser aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio. En otra realización, el cáncer puede ser de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.
- 35 En otra realización, el paciente puede estar en riesgo de cáncer. En otra realización, el paciente puede ser un paciente sin síntomas. En otra realización, la muestra de ensayo puede obtenerse a partir de un paciente en riesgo de cáncer. En otra realización, la muestra de ensayo puede obtenerse a partir de un paciente sin síntomas.
- 40 En otra realización, el anticuerpo puede unirse a un soporte sólido. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una perla, un tubo de ensayo, una lámina, una placa de cultivo, o una tira de ensayo. En otra realización, el soporte sólido puede ser una matriz.
- 45 En otra realización, la muestra puede ser una biopsia de tejido, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, exudado inflamatorio, sangre, suero, heces, o líquido recogido del tracto colorrectal.
- 50 En otra realización, el complejo de anticuerpo-epítipo puede detectarse mediante un ensayo seleccionado entre el grupos que consiste en transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayo de flujo lateral, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación mediante difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A.
- 55 En otra realización, el método puede detectar pólipos colorrectales. En otra realización, el método puede comprender además un ensayo adicional para la presencia de tumores. En otra realización, el método puede detectar tumores benignos. En otra realización, el método puede detectar tumores malignos. En otra realización, el método puede detectar tumores metastásicos. En otra realización, el método puede detectar tumores no
- 60
- 65



metastásicos. En otra realización, el método puede detectar células precancerosas que expresan un marcador celular que comprende un epítipo 31.1.

5 En otra realización, el método puede comprender la formación de imágenes de dicho epítipo. En otra realización, se puede seleccionar la formación de imágenes a partir del grupo que consiste en tomografía de emisión de positrones (PET), sistema de vigilancia CCD con poca luz, rayos x, exploración por TAC, gammagrafía, formación de imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, formación de imágenes paramagnéticas, y tomografía endoscópica de coherencia óptica.

10 En una realización, un método para preparar anticuerpos puede comprender (a) inmunizar un animal con un epítipo 31.1, (b) extraer el bazo de dicho animal y preparar una suspensión de células individuales, (c) fusionar un esplenocito con una célula de mieloma, (d) cultivar las células posteriores a la fusión en medio de selección de hibridoma, (e) cultivar los hibridomas resultantes, (f) cribar la producción de anticuerpos específicos, y (g) seleccionar los hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

15 En una realización, una composición puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

20 En una realización, una composición para tratar el cáncer puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

25 En una realización, una composición para retrasar el crecimiento de un tumor puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

30 En una realización, una composición para destruir las células tumorales puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

35 En una realización, una composición para promover la regresión del tumor puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de unión del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

En otra realización, la composición puede comprender tres de dichos anticuerpos.

40 En una realización, un método para tratar el cáncer puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita.

45 En una realización, un método para retrasar el crecimiento de un tumor puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita.

50 En una realización, un método para promover la regresión del tumor en un sujeto puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita.

55 En una realización, un método para destruir las células tumorales puede comprender administrar una cantidad eficaz de una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (c) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita.

En una realización, un método para detectar un epítipo NPC-1 asociado a tumor puede comprender (a) poner en contacto una muestra de ensayo con una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (i) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (ii) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (iii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita, y (b) evaluar los complejos anticuerpo-epítipo, donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma.

En una realización, un método para detectar la presencia de un epítipo asociado con un carcinoma en un paciente comprende (a) administrar a dicho paciente una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes: (i) un anticuerpo marcado, o un fragmento del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1; (ii) un anticuerpo marcado o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 16C3, y (iii) un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo del mismo marcado, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita, y (b) detectar la presencia de un epítipo unido mediante dicho anticuerpo, donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma.

En otra realización, el método puede comprender la administración de tres de dichos anticuerpos. En una realización adicional, el cáncer puede ser de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo de NPC-1 puede comprender una cadena pesada y ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 19, 20, 29, 30, 36, y 37, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 31, 32, 33; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 14, 15, 24, 25, 34, y 35, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 16, 17, 18, 26, 27, y 28.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo de 16C3 puede comprender una cadena pesada y ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 63, y 64, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 45, 46, 47, 65, 66, y 67; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 38, 39, 48, 49, 50, 51, 52, 58, y 59, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 40, 41, 42, 60, 61, y 62.

En una realización adicional, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo 31.1 puede comprender una cadena pesada y ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 69, 72, 73, 74, 75, 76, y 77 o una de las regiones variables contenidas en las anteriores, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 78, 79, 80, 81, 82, y 83; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 68, 70, 71, 84, 85, y 86 o una de las regiones variables contenidas en las anteriores, y 87, opcionalmente puede comprender al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, 90, 91, 92, y 93.

La invención proporciona un polipéptido aislado que comprende un epítipo 31.1. En una realización, el epítipo 31.1 puede no ser sensible al tratamiento por enzimas glicolíticas. En otra realización, el antígeno A33 puede comprender dicho epítipo 31.1. En otra realización, el epítipo 31.1 puede ser un epítipo no lineal. En una realización adicional, el epítipo 31.1 puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13.

La invención proporciona un antígeno específico de tumor que comprende una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13. En otra realización, el epítipo puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13. En una realización adicional, el epítipo puede ser un epítipo no lineal, que comprende opcionalmente la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12, o 13.

Un antígeno específico de tumor que comprende un epítipo 31.1. En otra realización, el epítipo específico de tumor puede comprender una secuencia de aminoácidos con al menos un 80% de homología con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 10, 11, 12 o 13.

Se muestran los aspectos fundamentales de la invención en las siguientes cláusulas:

Cláusula 1. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende al menos una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 74, 75, 76, o 77 o una de las regiones variables contenidas en la anterior.

Cláusula 2. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, que

comprende al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83.

Cláusula 3. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, 87 o una de las regiones variables contenidas en la anterior.

Cláusula 4. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33 o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93.

Cláusula 5. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho anticuerpo comprende al menos una de dichas cadenas pesadas o regiones variables de cadena pesada y al menos una de dichas cadenas ligeras o regiones variables de cadena ligera.

Cláusula 6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde dicho anticuerpo comprende al menos una de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos una de las mencionadas CDR de cadena ligera.

Cláusula 7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde dicho anticuerpo comprende al menos dos de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos dos de las mencionadas CDR de cadena ligera.

Cláusula 8 El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-7, donde el anticuerpo comprende al menos tres de las mencionadas CDR de cadena pesada y al menos tres de las mencionadas CDR de cadena ligera.

Cláusula 9. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-8, donde dicho anticuerpo comprende al menos una secuencia de cadena pesada que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74, 75, 76, u 77; al menos una secuencia de la CDR que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, 79, 80, 81, 82, u 83; al menos una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:84, 85, 86, o 87; y al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera que comprende al menos una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:88, 89, 90, 91, 92, o 93.

Cláusula 10. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-10, donde dicha cadena pesada comprende una CDR1 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:78, al menos una CDR2 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 79, 80, 81 u 82; y al menos una CDR3 de cadena pesada de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:83.

Cláusula 11. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-10, donde dicha cadena ligera comprende al menos una CDR1 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, o 90, al menos una CDR2 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NOS: 91 o 92; y una CDR3 de cadena ligera de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:93.

Cláusula 12. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-11, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 11, 12 o 13.

Cláusula 13. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-12, donde dicho anticuerpo o fragmento es recombinante.

Cláusula 14. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-12, donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo tiene actividad antitumoral.

Cláusula 15. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-12, donde dicho fragmento de anticuerpo es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, CDR, parátipo, o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno.

Cláusula 16. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-15, donde dicho anticuerpo o fragmento se conjuga de forma directa o indirecta con una marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, y/o dicho anticuerpo potencia ADCC o CDC y/o dicho anticuerpo es un isotipo de una IgG1 humana o un isotipo de una IgG3 humana.

Cláusula 17. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-15, donde dicho anticuerpo se premezcla en una composición con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor.

Cláusula 18. El anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-15, donde dicho anticuerpo se administra en combinación con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, de forma simultánea o secuencial.

Cláusula 19. El anticuerpo de la cláusula 16, 17 o 18, donde dicha marca es una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva.

Cláusula 20. El anticuerpo de la cláusula 19, donde dicha marca paramagnética es aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio.

Cláusula 21. El anticuerpo de la cláusula 16, 17 o 18, donde el agente citotóxico es un resto que inhibe el ADN, ARN, o la síntesis de proteínas, un radionucleido, o una proteína inhibidora de ribosomas.

Cláusula 22. El anticuerpo de la cláusula 21, donde el agente citotóxico puede ser <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>188</sup>Re, <sup>90</sup>Y, vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica pokeweed, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de la *difteria*, cadena de ricina A, o enzima fosfolipasa citotóxica.

Cláusula 23. El anticuerpo de la cláusula 16, 17 o 18, donde dicho agente terapéutico es una linfoquina o factor de crecimiento.

Cláusula 24. El anticuerpo de la cláusula 16, 17 o 18, donde dicho agente inmunosupresor es ciclosporina, leflunomida, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, tacrolimus, o sirolimus.

Cláusula 25. Una composición que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

Cláusula 26. La composición de la cláusula 25, donde dicha composición comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.

Cláusula 27. Un kit diagnóstico que comprende el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

5 Cláusula 28. El kit de la cláusula 27, donde el anticuerpo puede fijarse de forma directa o indirecta a un soporte de fase sólida.

Cláusula 29. El kit de la cláusula 28, donde dicho soporte de fase sólida es una perla, un tubo de ensayo, una lámina, una placa de cultivo, o una tira de ensayo.

Cláusula 30. El kit de la cláusula 29, donde dicho soporte de fase sólida es una matriz.

10 Cláusula 31. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 a un paciente que lo necesita.

Cláusula 32. Un método para retrasar el crecimiento de un tumor que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 a un paciente que lo necesita.

15 Cláusula 33. Un método para destruir células tumorales que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 a un paciente que lo necesita.

Cláusula 34. Un método para promover la regresión tumoral en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 a un paciente que lo necesita.

20 Cláusula 35. Una composición para tratar el cáncer que comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la misma de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

Cláusula 36. Una composición para retrasar el crecimiento de un tumor que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

Cláusula 37. Una composición para destruir células tumorales que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

25 Cláusula 38. Una composición para promover la regresión tumoral en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24.

Cláusula 39. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 en la preparación de un medicamento para tratar el cáncer.

30 Cláusula 40. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 en la preparación de un medicamento para retrasar el crecimiento de un tumor.

Cláusula 41. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 en la preparación de un medicamento para destruir células tumorales.

Cláusula 42. Uso del anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de una cualquiera de las cláusulas 1-24 en la preparación de un medicamento para promover la regresión tumoral.

35 Cláusula 43. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

Cláusula 44. La composición, uso, o método de la cláusula 43, donde dicho cáncer es cáncer de páncreas o cáncer colorrectal.

40 Cláusula 45. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho anticuerpo se administra en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina, o un factor de crecimiento hematopoyético.

Cláusula 46. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho agente se administrar de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo.

45 Cláusula 47. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

Cláusula 48. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho cáncer es un cáncer en el estadio 1, 2, 3 o 4.

Cláusula 49. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho cáncer ha metastatizado.

50 Cláusula 50. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde el paciente expresa niveles detectables de un epítipo 31.1.

Cláusula 51. La composición, uso, o método de la cláusula 50, donde el antígeno tumoral se detecta en una muestra de biopsia de un tumor o en la sangre, heces, orina o líquido linfático.

Cláusula 52. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde el paciente está en riesgo de cáncer.

55 Cláusula 53. La composición, uso, o método de una cualquiera de las cláusulas 31-42, donde dicho paciente es un paciente sin síntomas.

Cláusula 54. Un método para detectar un epítipo 31.1 que comprende

60 (a) poner en contacto una muestra de ensayo con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24, que se une a un epítipo 31.1, y

(b) evaluar los compuestos de anticuerpo-epítipo,

donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma.

65 Cláusula 55. Un método para detectar la presencia de un epítipo 31.1 en un paciente que comprende

(a) administrar a dicho paciente el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-

24, donde dicho anticuerpo que está marcado, se une a un epítipo 31.1 y  
(b) detectar la presencia de un epítipo 31.1;

donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma.

5 Cláusula 56. El método de la cláusula 54 o 55, donde dicho anticuerpo o fragmento se conjuga con una marca.  
Cláusula 57. El método de la cláusula 56, donde dicha marca es una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva.

10 Cláusula 58. El método de la cláusula 57, donde dicha marca paramagnética es aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio.

Cláusula 59. El método de la cláusula 54 o 55, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

Cláusula 60. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-59, donde el paciente está en riesgo de cáncer.

15 Cláusula 61. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-59, donde dicho paciente es un paciente sin síntomas.

Cláusula 62. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-59, donde la muestra de ensayo se obtiene a partir de un paciente en riesgo de cáncer.

Cláusula 63. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-59, donde la muestra de ensayo se obtiene a partir de un paciente sin síntomas.

20 Cláusula 64. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-59, donde dicho anticuerpo se une a un soporte sólido.

Cláusula 65. El método de la cláusula 64, donde dicho soporte de fase sólida es una perla, un tubo de ensayo, una lámina, una placa de cultivo, o una tira de ensayo.

Cláusula 66. El método de la cláusula 65, donde dicho soporte sólido es una matriz.

25 Cláusula 67. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-66, donde dicha muestra es una biopsia de tejido, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, exudado inflamatorio, sangre, suero, heces, o líquido recogido del tracto colorrectal.

30 Cláusula 68. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-66, donde el complejo de anticuerpo-epítipo puede detectarse mediante un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayo de flujo lateral, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación mediante difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A.

35 Cláusula 69. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-68, donde dicho método detecta pólipos colorrectales.

Cláusula 70. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-68, donde dicho método comprende además un ensayo adicional para la presencia de tumores.

Cláusula 71. El método de la cláusula 70, donde dicho método detecta tumores benignos.

Cláusula 72. El método de la cláusula 70, donde dicho método detecta tumores malignos.

40 Cláusula 73. El método de la cláusula 70, donde dicho método detecta tumores metastásicos.

Cláusula 74. El método de la cláusula 70, donde dicho método detecta tumores no metastásicos.

Cláusula 75. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-74, donde dicho método detecta células precancerosas que expresan un marcador celular que comprende un epítipo 31.1.

45 Cláusula 76. El método de una cualquiera de las cláusulas 54-75, donde el método puede comprender la formación de imágenes de dicho epítipo.

Cláusula 77. El método de la cláusula 76, donde dicha formación de imágenes se selecciona a partir del grupo que consiste en tomografía de emisión de positrones (PET), sistema de vigilancia CCD con poca luz, rayos x, exploración por TAC, gammagrafía, formación de imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, formación de imágenes paramagnéticas, y tomografía endoscópica de coherencia óptica.

50 Cláusula 78. Un método para preparar anticuerpos que comprende

(a) inmunizar un animal con un epítipo 31.1,

(b) extraer el bazo de dicho animal y preparar una suspensión de células individuales,

55 (c) fusionar un esplenocito con una célula de mieloma,

(d) cultivar las células posteriores a la fusión en medio de selección de hibridoma,

(e) cultivar los hibridomas resultantes,

(f) cribar la producción de anticuerpos específicos, y

(g) seleccionar hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

60

Cláusula 79. Una composición que comprende al menos dos de los siguientes:

(a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;

(b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y

65 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

Cláusula 80. Una composición para tratar el cáncer que comprende al menos dos de los siguientes:

- 5 (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;  
 (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y  
 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

Cláusula 81. Una composición para retrasar el crecimiento de un tumor puede comprender al menos dos de los siguientes:

- 10 (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;  
 (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y  
 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

15 Cláusula 82. Una composición para destruir las células tumorales que comprende al menos dos de los siguientes:

- (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;  
 (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y  
 20 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

Cláusula 83. Una composición para promover la regresión del tumor que comprende al menos dos de los siguientes:

- 25 (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;  
 (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y  
 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1.

Cláusula 84. La composición de una cualquiera de las cláusulas 79-83, donde la composición comprende tres de dichos anticuerpos.

30 Cláusula 85. La composición de una cualquiera de las cláusulas 79-83, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

Cláusula 86. La composición de una cualquiera de las cláusulas 79-83, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo de NPC-1 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 19, 20, 29, 30, 36, y 37, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 31, 32, 33; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 14, 15, 24, 25, 34, y 35, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 16, 17, 18, 26, 27, y 28.

40 Cláusula 87. La composición de una cualquiera de las cláusulas 79-83, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo de 16C3 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 63, y 64, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 45, 46, 47, 65, 66, y 67; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 38, 39, 48, 49, 50, 51, 52, 58, y 59, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 40, 41, 42, 60, 61, y 62.

45 Cláusula 88. La composición de una cualquiera de las cláusulas 79-83, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo 31.1 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 69, 72, 73, 74, 75, 76, y 77, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 78, 79, 80, 81, 82, y 83; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 68, 70, 71, 84, 85, 86, y 87, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, 90, 91, 92, y 93.

50 Cláusula 89. Un método para tratar el cáncer que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición y que comprende al menos dos de los siguientes:

- 60 (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de NPC-1;  
 (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo de 16C3; y  
 (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítipo 31.1 en un paciente que lo necesita.

65 Cláusula 90. Un método para retrasar el crecimiento de un tumor que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos dos de los siguientes:

- (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de NPC-1;
- (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de 16C3; y
- (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo 31.1 en un paciente que lo necesita.

5 Cláusula 91. un método para promover la regresión del tumor en un sujeto que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición y puede comprender al menos dos de los siguientes:

- (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de NPC-1;
- (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de 16C3; y
- (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo 31.1 en un paciente que lo necesita.

15 Cláusula 92. Un método para destruir las células tumorales que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición que comprende al menos dos de los siguientes:

- (a) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de NPC-1;
- (b) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de 16C3; y
- (c) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo 31.1 en un paciente que lo necesita.

20 Cláusula 93. Un método para detectar un epítopo de NPC-1 asociado a tumor que comprende

25 (a) poner en contacto una muestra de ensayo con una composición que comprende al menos dos de los siguientes:

- (i) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de NPC-1;
- (ii) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de 16C3; y
- (iii) un anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo 31.1 en un paciente que lo necesita, y

30 (b) evaluar los compuestos de anticuerpo-epítopo, donde la presencia de dicho epítopo es indicativa de un carcinoma.

35 Cláusula 94. Un método para detectar la presencia de un epítopo asociado con un carcinoma en un paciente que comprende

(a) administrar a dicho paciente una composición que comprende al menos dos de los siguientes:

- (i) un anticuerpo marcado, o un fragmento del mismo, que se une a un epítopo de NPC-1;
- (ii) un anticuerpo marcado o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo de 16C3; y
- (iii) un anticuerpo marcado o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un epítopo 31.1 en un paciente que lo necesita, y

45 (b) detectar la presencia de un epítopo unido por dicho anticuerpo, donde la presencia de dicho epítopo es indicativa de un carcinoma.

Cláusula 95. El método de una cualquiera de las cláusulas 89-94, donde dicho método comprende la administración de tres de dichos anticuerpos.

50 Cláusula 96. El método de una cualquiera de las cláusulas 89-94, donde dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado.

Cláusula 97. El método de una cualquiera de las cláusulas 89-94, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítopo de NPC-1 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 19, 20, 29, 30, 36, y 37, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 21, 22, 23, 31, 32, 33; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 14, 15, 24, 25, 34, y 35, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 16, 17, 18, 26, 27, y 28.

60 Cláusula 98. El método de una cualquiera de las cláusulas 89-94, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítopo de 16C3 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 43, 44, 53, 54, 55, 56, 57, 63, y 64, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 45, 46, 47, 65, 66, y 67; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 38, 39, 48, 49, 50, 51, 52, 58, y 59, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de

aminoácidos de SEQ ID NOS: 40, 41, 42, 60, 61, y 62.

Cláusula 99. El método de una cualquiera de las cláusulas 89-94, donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo que se une a un epítipo 31.1 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde dicha cadena pesada se selecciona entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 69, 72, 73, 74, 75, 76, y 77, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena pesada de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 78, 79, 80, 81, 82, y 83; y la cadena ligera se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NOS: 68, 70, 71, 84, 85, 86, y 87, que comprende opcionalmente al menos una secuencia de la CDR de cadena ligera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 88, 89, 90, 91, 92, y 93.

Cláusula 100. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las cláusulas 1 a 24 o una cadena pesada o una cadena ligera del mismo.

Cláusula 101. El ácido nucleico aislado de la cláusula 100 que está contenido en un vector o célula hospedadora.

Cláusula 102. Un método de preparar el anticuerpo de una cualquiera de las cláusulas 1-24, que comprende expresar un ácido nucleico de acuerdo con la cláusula 100 en una célula o un sistema de traducción exento de células, y opcionalmente, purificar dicho anticuerpo.

### Breve descripción de los dibujos

La **Figura 1A-D** representa gráficamente las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada variable del anticuerpo monoclonal NEO-303 humanizado. La región variable de cdr31.1, abb31.1, y sdr31.1 se muestra en negrita. Para cada una de las cuatro cadenas pesadas de anticuerpo representadas gráficamente, la región variable tiene aproximadamente 118 aminoácidos de longitud, comienza en el extremo N con la secuencia "QIQ" y finaliza con la secuencia "VSS". La **Figura 1E** representa gráficamente una alineación de secuencias entre las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 74-77 incluyendo las CDR (subrayadas) (las secuencias de aminoácidos de la CDR se proporcionan también por separado en las SEQ ID NOS: 78-83). Las diferencias de secuencias entre estas cuatro secuencias de cadena pesada se incluyen en la región CDR2. La FIG. 1A muestra el polipéptido de SEQ ID NO:74. La FIG. 1B muestra el polipéptido de SEQ ID NO:75. La FIG. 1C muestra el polipéptido de SEQ ID NO:76. La FIG. 1D muestra el polipéptido de SEQ ID NO:77. La FIG 1E muestra la alineación de las SEQ ID NOS:74, 75, 76, y 77, respectivamente.

La **Figura 2A-D** representa gráficamente las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera variable del anticuerpo monoclonal NEO-303 humanizado. La región variable de cdr31.1, abb31.1, y sdr31.1 se muestra en negrita. Para cada una de las cuatro cadenas ligeras de anticuerpo representadas gráficamente, la región variable tiene aproximadamente 107 aminoácidos de longitud, comienza en el extremo N con la secuencia "SIV" o "SIQ" y finaliza con la secuencia "EIK" o "ELK". La **Figura 2E** representa gráficamente una alineación de secuencias entre las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOS: 84-87 incluyendo las CDR (subrayadas) (las secuencias de aminoácidos de la CDR se proporcionan también por separado en las SEQ ID NOS: 88-93). Las diferencias de secuencias entre estas cuatro secuencias de cadena ligera, se incluyen en la región CDR1, así como en la región marco 1 (FR1) que se extiende desde el primer aminoácido al aminoácido exactamente antes del inicio de la secuencia de la CDR1) y la región del marco 4 (FR4) (comenzando con el primer aminoácido del resto C en la secuencia de la CDR3 y que se obtiene el extremo del dominio variable). La FIG. 2A muestra el polipéptido de SEQ ID NO:84. La FIG. 2B muestra el polipéptido de SEQ ID NO:85. La FIG. 2C muestra el polipéptido de SEQ ID NO:86. La FIG. 2D muestra el polipéptido de SEQ ID NO:87. La FIG 2E muestra la alineación de las SEQ ID NOS:84, 85, 86, y 87, respectivamente.

La **Figura 3** representa gráficamente la relación efector a tumor para los anticuerpos 17.7A (control), 31.1 de murino, y NEO-301.

La **Figura 4** representa gráficamente un estudio de control del crecimiento tumoral que no muestra efecto de la IgG humana sobre el crecimiento del tumor durante 30 días.

La **Figura 5** representa gráficamente el retraso del crecimiento tumoral tras la administración de NEO-301 quimérico solo (monoterapia) durante 30 días.

La **Figura 6** representa gráficamente el retraso del crecimiento tumoral tras la administración de NEO-301 quimérico con células efectoras humanas [PMNC (células polimorfonucleares) (tratamiento combinado)] durante 30 días.

La **Figura 7** muestra la tinción del azul de Coomassie de dos anticuerpos 31.1 humanizados, concretamente n.º 5 y n.º 6, en condiciones no reductoras y reductoras.

La **Figura 8** muestra los resultados de los ensayos ELISA utilizando dos anticuerpos 31.1 humanizados, concretamente n.º 5 y n.º 6, así como las formas biotiniladas de los mismos.

La **Figura 9** muestra la tinción del azul de Coomassie de dos anticuerpos 31.1 humanizados, concretamente n.º 11 y n.º 16, en condiciones no reductoras y reductoras.

La **Figura 10** muestra los resultados de los ensayos ELISA utilizando dos anticuerpos 31.1 humanizados, concretamente los n.º 11 y n.º 16.

La **Figura 11** muestra los resultados de citometría de flujo utilizando dos anticuerpos 31.1 humanizados, concretamente n.º 11 y n.º 16, para teñir las células AsPC-1 (línea de células de cáncer de páncreas).

La **Figura 12** muestra los resultados de la tinción inmunohistoquímica de cáncer de colon con metástasis al hígado utilizando 31.1 n.º 11 y n.º 16.

La **Figura 13** muestra la función ADCC de los anticuerpos 31.1 humanizados n.º 16 (la barra más a la izquierda en cada grupo), n.º 6 (segunda barra desde la izquierda en cada grupo), 31.1 quimérico (tercera barra desde la



izquierda en cada grupo) e IgG humana del control (la barra más a la derecha en cada grupo).

La **Figura 14** muestra el efecto antitumoral del anticuerpo 31.1 humanizado n.º 16 (línea inferior) en un modelo de xenoinjerto AsPC-1 (cáncer de páncreas), en comparación con la IgG humana del control (línea superior). Se inyectó el anticuerpo en los días 0, 3 y 6, y se inyectaron PMBC en los días 1, 4 y 7. El tamaño promedio del tumor disminuyó marcadamente en ratones a los que se había inyectado anticuerpo 31.1 humanizado n.º 16.

### Descripción detallada de la invención

A fin de que la invención descrita en el presente documento pueda entenderse completamente, se muestra la siguiente descripción detallada. Se describen en detalle diversas realizaciones de la invención y pueden ilustrarse adicionalmente mediante los ejemplos proporcionados.

### Definiciones

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Aunque se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la invención o en el ensayo de la presente invención., se describen en el presente documento métodos y materiales adecuados. Los materiales, métodos y ejemplos son únicamente ilustrativos y no pretende que sean limitantes.

Como se usa en la descripción en el presente documento y en todas las reivindicaciones que siguen, el significado de "un" "uno/a", y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa.

"Aminoácido", como se usa en el presente documento se refiere de forma amplia a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como a análogos de aminoácidos y aminoácidos miméticos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos modificados que están modificados posteriormente, *por ejemplo*, hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura básica que un aminoácido de origen natural, *es decir*, un carbono que se une a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, *por ejemplo*, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o estructuras peptídicas modificadas, pero retienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural. Los aminoácidos miméticos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácidos, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido de origen natural.

"Anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquier estructura molecular que contiene una cadena polipeptídica con una forma específica que se ajusta a y reconoce un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, de todas las fuentes, *por ejemplo*, seres humanos, roedores, conejos, vacas, ovejas, cerdos, perros, pollos, se considera que son "anticuerpos". Los anticuerpos incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y otros anticuerpos de mamíferos no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios (scFv), camelbodies, nanocuerpos, IgNAR (anticuerpos monocatenarios derivados de tiburones), productos inmunofarmacéuticos pequeños modulares (SMIP), y fragmentos de anticuerpos (*por ejemplo*, Fabs, Fab', F(ab')<sub>2</sub>) se han descrito numerosas secuencias de codificación de anticuerpos; y otras pueden plantearse mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase Streltsov, et al. (2005) Protein Sci. 14(11): 2901-9; Greenberg, et al. (1995) Nature 374(6518): 168-173; Nuttall, et al. (2001) Mol Immunol. 38(4): 313-26; Hamers-Casterman, et al. (1993) Nature 363(6428): 446-8; Gill, et al. (2006) Curr Opin Biotechnol. 17(6): 653-8.

"Antígeno" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una molécula o una porción de una molécula capaz de unirse mediante un anticuerpos que es capaz adicionalmente de inducir a un animal a producir un anticuerpo capaz de unirse a un epítipo de este antígeno. Un antígeno puede tener un epítipo, o tener más de un epítipo. La reacción específica referida en el presente documento indica que el antígeno reaccionará, de una manera muy selectiva, que su anticuerpo correspondiente y no con la multitud de anticuerpos diferentes que pueden ser evocados por otros antígenos. Los antígenos pueden ser específicos de tumor (por ejemplo, expresados por células neoplásicas de carcinoma de páncreas y colon).

"Cáncer", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquier enfermedad neoplásica (tanto invasiva como metastásica) caracterizada por una división celular anómala y descontrolada que produce un crecimiento o tumor maligno.

"Anticuerpo quimérico, como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una molécula de anticuerpo donde la región constante, o una parte de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada de tal manera que el sitio de unión a antígeno (región variable) se une a una región constante de una clase diferente o

alterada, una función y/o una especie efectora, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, *por ejemplo*, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco; o la región variable, o una parte de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad por el antígeno diferente o alterada.

5 "Variantes modificadas de forma conservativa", como se usa en el presente documento, se aplica a secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos, y con respecto a secuencias de ácido nucleico concretas, se refiere de forma amplia a variantes modificadas de forma conservativa que se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o donde el ácido nucleico no codifica una secuencia  
10 de aminoácidos, de secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Dichas variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas conservativamente. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido describe también cada  
15 posible variación silenciosa del ácido nucleico. Una persona reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG que es normalmente el único codón para la metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para el triptófano) puede modificarse para dar como resultado una molécula funcionalmente idéntica.

"región determinante de la complementariedad", "región hipervariable", o "CDR", como se usa en el presente documento, se refieren de forma amplia a una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) o  
20 regiones hipervariables que se encuentran en las regiones variables de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo. Véase Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina. Estas expresiones incluyen las regiones hipervariables como se definen por Kabat, et al. (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" U.S. Dept. of Health and Human Services o los bucles hipervariables en las estructuras tridimensionales de los anticuerpos. Chothia y Lesk (1987) J Mol. Biol.  
25 196: 901-917. Las CDR en cada cadena se mantienen en proximidad estrecha por las regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno. En las CDR se seleccionan aminoácidos que se han descrito como regiones determinantes de la selectividad (SDR que representan los restos de contacto crítico utilizados por la CDR en la interacción antígeno-anticuerpo. Kashmiri (2005) Methods 36: 25-34.

30 "Cantidad de control", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un marcador que puede estar en cualquier cantidad o intervalo de cantidades para compararse contra una cantidad de ensayo de un marcador. Por ejemplo, una cantidad de control de un marcador puede ser la cantidad de un marcador en un paciente con una enfermedad o dolencia concreta o una persona sin dicha enfermedad o dolencia. Una cantidad de control puede ser tanto una cantidad absoluta (*por ejemplo*, microgramos/ml) como una cantidad relativa (por  
35 ejemplo, intensidad relativa de señales).

"Diferencialmente presente", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a diferencias en la cantidad o calidad de un marcador presente en una muestra tomada de pacientes que tienen una enfermedad o dolencia en comparación con una muestra comparable tomada de pacientes que no tienen una de las enfermedades o dolencias. Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico puede opcionalmente estar diferencialmente presente  
40 entre las dos muestras si la cantidad del fragmento de ácido nucleico en una muestra es significativamente diferente de la cantidad del fragmento de ácido nucleico en la otra muestra, como se mide, por ejemplo, mediante hibridación y/o ensayos basados en NAT. Un polipéptido está diferencialmente presente entre las dos muestras si la cantidad del polipéptido en una muestra es significativamente diferente de la cantidad del polipéptido en la otra muestra. Debe señalarse que si el marcador es detectable en una muestra y no detectable en la otra, entonces, dicho marcador puede considerarse que está diferencialmente presente. Opcionalmente, una cantidad relativamente baja de regulación en exceso puede servir como el marcador.

"Diagnóstico" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a la presencia o naturaleza de una dolencia patológica. Los métodos diagnósticos difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de "verdaderos positivos"). Las enfermedades individuales no detectadas por el ensayo son "falsos negativos". Los sujetos que no están enfermos y que dan negativo en el ensayo se denominan "verdaderos negativos". La "especificidad" de un ensayo diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción  
50 de aquellos sin la enfermedad que dan positivos. Mientras que un método de diagnóstico concreto puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una dolencia, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayuda en el diagnóstico.

"Diagnosticar", como se usa en el presente documento se refiere de forma amplia a clasificar una enfermedad o un síntoma, determinar la gravedad de la enfermedad, vigilar la progresión de la enfermedad, pronosticar un resultado de una enfermedad y/o las perspectivas de la recuperación. El término "detectar" puede también opcionalmente abarcar cualquiera de los anteriores. El diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con la presente invención puede, en algunas realizaciones, verse alterado por la determinación de un nivel de un polinucleótido o un polipéptido de la presente invención en una muestra biológica obtenida del sujeto, donde el nivel determinado puede estar correlacionado con la predisposición a, o la presencia o ausencia de la enfermedad. Debe señalarse que una  
65 "muestra biológica obtenida del sujeto" puede comprender también opcionalmente una muestra que no se ha

extraído físicamente del sujeto.

- 5 "Cantidad eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a la cantidad de un compuesto, anticuerpo, antígeno, o células que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para la profilaxis, y/o una cantidad eficaz para la prevención. La cantidad eficaz puede ser una cantidad eficaz para reducir, una cantidad eficaz para prevenir la incidencia de signos/síntomas, para reducir la gravedad de la incidencia de signos/síntomas, para eliminar la incidencia de signos/síntomas, para retrasar el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, para prevenir el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, y/o para efectuar la profilaxis de la incidencia de signos/síntomas. La "cantidad eficaz" puede variar dependiendo de la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, antecedentes médicos, susceptibilidad, y condiciones preexistentes, del paciente que se va a tratar. La expresión "cantidad eficaz" se sinónima de "cantidad terapéuticamente eficaz" para los fines de la presente invención.
- 10
- 15 "vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquier sistema de expresión recombinante para los fines de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, de forma constitutiva o inducible, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levaduras, de hongos, vegetales, de insectos o células de mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye sistemas de expresión que siguen siendo episómicos o se integran en el genoma de la célula hospedadora. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de autorreplicarse o no, *es decir*, de impulsar solo la expresión transitoria en una célula. El término incluye casetes de expresión recombinantes que contienen solo los elementos mínimos necesarios para la transcripción del ácido nucleico recombinante.
- 20
- 25 "Región marco" o "FR" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una o más regiones marco en las regiones hipervariables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Véase Kabat, et al. (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Doctor en medicina. Estas expresiones incluyen aquellas regiones de secuencias de aminoácidos intercaladas entre las CDR en las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo.
- 30
- 35 "Heterólogo", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a porciones de un ácido nucleico que indican que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce normalmente de forma recombinante, que tiene dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para preparar un nuevo ácido nucleico funcional, *por ejemplo*, un promotor procedente de una fuente y una región de codificación procedente de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (*por ejemplo*, una proteína de fusión).
- 40
- "Alta afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un anticuerpo que tiene una KD de al menos  $10^{-8}$  M, más preferentemente al menos  $10^{-9}$  M e incluso más preferentemente al menos  $10^{-10}$  M para un antígeno diana. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de alta afinidad para un isotipo de IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de al menos  $10^{-7}$  M, más preferentemente al menos  $10^{-8}$  M.
- 45
- 50 "Homología", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un grado de similitud entre una secuencia de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico de referencia o entre una secuencia polipeptídica y una secuencia polipeptídica de referencia. La homología puede ser parcial o completa. la homología completa indica que las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos son idénticas. Una secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos parcialmente homóloga es una que no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico o de aminoácidos de referencia. Se puede determinar el grado de homología mediante comparación de secuencias. La expresión "identidad de secuencias" se puede usar de manera indistinta con "homología".
- 55
- "Célula hospedadora", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una célula que contiene un vector de expresión y soporta la replicación o la expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como E. coli, o células eucariotas tales como levaduras, células de insectos (*por ejemplo*, SF9), anfibios, o mamíferos tales como CHO, HeLa, HEK-293, *por ejemplo*, células cultivadas, explantes, y células *in vivo*.
- 60
- "Hibridación" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a la interacción física de hebras de polinucleótidos complementarios (incluyendo parcialmente complementarios) mediante la formación de enlaces de hidrógeno entre nucleótidos complementarios cuando las hebras se disponen antiparalelas entre sí.
- 65
- "K-asoc" o "Ka", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a la constante de asociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta, mientras que los términos "Kdis" o "Kd", como se usa en el presente documento, se refieren a la constante de disociación de una interacción antígeno-anticuerpo concreta. Se pretende que el término "KD", como se usa en el presente documento, se refiera a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de Kd a Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Se pueden

determinar los valores de KD para los anticuerpos utilizando métodos bien establecidos en la técnica.

"Inmunoensayo", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un ensayo que utiliza un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno. El inmunoensayo puede caracterizarse mediante el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo para aislar, dirigir, y/o cuantificar el antígeno.

"Aislado", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia al material retirado de su entorno original donde se produce naturalmente, y por tanto es alterado mediante la manipulación del hombre de su entorno natural. Material aislado puede ser, por ejemplo, ácido nucleico exógeno incluido en un sistema vectorial, ácido nucleico exógeno contenido en una célula hospedadora, o cualquier material que se ha retirado de su entorno original y por tanto alterado por la manipulación del hombre (por ejemplo, "anticuerpo aislado").

"Marca" o un "resto detectable" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunquímicos, químicos, u otros medios físicos.

"Rigor bajo", "rigor medio", "rigor alto", o "condiciones de rigor muy altas", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a condiciones para la hibridación y el lavado del ácido nucleico. Se pueden encontrar directrices para llevar a cabo reacciones de hibridación en Ausubel, et al. (2002) Short Protocols in Molecular Biology (5ª Ed.) John Wiley & Sons, NY. Las condiciones de hibridación específicas ilustrativas incluyen, aunque no de forma limitativa: (1) condiciones de hibridación de rigor bajo en 6X cloruro de sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en 0,2XSSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55°C para condiciones de bajo rigor); (2) condiciones de hibridación de rigor medio en 6XSSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2XSSC, SDS al 0,1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación de rigor alto en 6XSSC a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en 0,2XSSC, SDS al 0,1% a 65°C; y las (4) condiciones de hibridación de rigor muy alto son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados en 0,2XSSC, SDS al 1% a 65°C.

"Mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquiera y todos los animales vertebrados de sangre caliente de la clase mamíferos, incluyendo seres humanos, caracterizados por una cubierta de pelo sobre la piel y, en la hembra, glándulas mamarias productoras de leche para alimentar a los jóvenes. Los ejemplos de mamíferos incluyen, aunque no de forma limitativa alpacas, armadillos, capibaras, gatos, camellos, chimpancés, chinchillas, ganado, perros, burros, cabras, gorilas, hámsteres, caballos, seres humanos, lémures, llamas, ratones, primates no humanos, cerdos, ratas, ovejas, musarañas, ardillas, y tapires. Los mamíferos incluyen, aunque no de forma limitativa bovinos, cánidos, equinos, felinos, murinos, ovinos, porcinos, primates, y especies de roedores. Los mamíferos incluyen también cualquiera y todos aquellos relacionados en las Especies de Mamíferos del Mundo mantenidas por el National Museum of Natural History, Smithsonian Institution en Washington DC.

"Ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un oligonucleótido desoxirribonucleótido o ribonucleótido tanto en forma monocatenaria como bicatenaria. La expresión abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. La expresión abarca también estructuras similares a ácidos nucleicos con estructuras principales sintéticas. Salvo que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico concreta abarca también implícitamente variantes modificadas de forma conservativa de las mismas (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. La expresión ácido nucleico se usa de forma indistinta con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

"Unido operativamente", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a dos fragmentos de ADN que se unen de tal manera que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en marco.

"Parátopo", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un anticuerpo que reconoce un antígeno (*por ejemplo*, el sitio de unión al antígeno de un anticuerpo). Los parátomos pueden ser una pequeña región (*por ejemplo*, 15-22 aminoácidos) de la región Fv del anticuerpo y puede contener partes de la cadena pesada y ligera del anticuerpo. Véase Goldsby, et al. Antigens (Capítulo 3) Immunology (5ª Ed.) Nueva York: W.H. Freeman and Company, páginas 57-75.

"Paciente", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un animal que necesita tratamiento tanto para aliviar un estado de enfermedad como para prevenir la incidencia o la recurrencia de un estado de enfermedad. Asimismo, "Paciente" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquier animal que tiene factores de riesgo, antecedentes de enfermedades, susceptibilidad, síntomas, signos, que se habían diagnosticado anteriormente, está en riesgo de, o es miembro de una población de pacientes para una enfermedad. El paciente puede ser un paciente clínico tal como un ser humano o un paciente veterinario tal como un animal de compañía, domesticado, de ganadería, exótico, o un animal de zoo. El término "sujeto" se puede usar de forma indistinta con el término "paciente".

- "Polipéptido" "péptido" y "proteína", se usan de manera indistinta y se refieren de forma amplia a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos donde uno o más restos de aminoácidos es(son) un análogo o mimético de un aminoácido de origen natural, así como polímeros de aminoácidos de origen natural. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos donde uno o más restos de aminoácidos es(son) un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. Los polipéptidos se pueden modificar, *por ejemplo*, mediante la adición de restos de hidratos de carbono para formar glicoproteínas. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen glicoproteínas, así como no glicoproteínas.
- "Promotor", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una matriz de secuencias de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en el presente documento, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias próximas al sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de la polimerasa de tipo II, un elemento TATA. Un promotor incluye también opcionalmente un potenciador distal o elementos represores, que se pueden localizar tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está activo bajo la regulación ambiental o de desarrollo.
- "Cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente para la profilaxis de una enfermedad o la prevención de la reincidencia de una enfermedad, es suficiente para efectuar dicha profilaxis para la enfermedad o la reincidencia. La cantidad profilácticamente eficaz puede ser una cantidad eficaz para prevenir la incidencia de signos y/o síntomas. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar dependiendo de la enfermedad y su gravedad y la edad, peso, antecedentes médicos, predisposición a dolencias, dolencias preexistentes, del paciente que se va a tratar.
- "Profilaxis", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un curso de tratamiento donde los signos y/o síntomas no están presentes en el paciente, están en remisión, o estuvieron anteriormente presentes en un paciente. La profilaxis incluye prevenir la enfermedad que se produce posterior al tratamiento de una enfermedad en un paciente. Además, la prevención incluye tratar pacientes que pueden desarrollar potencialmente la enfermedad, especialmente pacientes que son susceptibles a la enfermedad (por ejemplo, los miembros de una población de pacientes, aquellos con factores de riesgo, o en riesgo de desarrollar la enfermedad).
- "Recombinante" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia con referencia a un producto, *por ejemplo*, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogos o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula modificada de esta manera. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresa genes nativos que se expresan anómalamente de otra forma, expresados por defecto o no expresados en absoluto.
- "se une de forma específica (o selectivamente)" a un anticuerpo o "inmunoreacciona de forma específica (o selectivamente) con", o "interactúa o se une específicamente", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a una proteína o péptido (u otro epitopo), se refiere, en algunas realizaciones, a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros productos biológicos. Por ejemplo, en condiciones de inmunoensayo diseñadas, los anticuerpos especificados se unen a una proteína concreta al menos 2 veces más que el fondo (señal no específica) y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces una señal de fondo o ruido y más normalmente de aproximadamente 10 a 100 veces de fondo.
- "Hibridable de forma específica" y "complementaria" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un ácido nucleico que puede formar enlace(s) de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico mediante tipos de Watson-Crick tradicionales u otros tipos no tradicionales. La energía libre de la unión de una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que continúe la función relevante del ácido nucleico, *por ejemplo*, actividad del ARNi. La determinación de las energías libres de la unión de las moléculas es bien conocido en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Turner, et al. (1987) CSH Symp. Quant. Biol. LII: 123-33; Frier, et al. (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner, et al. (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de restos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 siendo aproximadamente al menos 50%, 60 %, 70%, 80%, 90% y 100% complementaria, inclusive). "Perfectamente complementario" o 100% de complementariedad se refiere de forma amplia a todos los restos contiguos de un enlace de hidrógeno de una secuencia de ácidos nucleicos con el mismo número de restos contiguos en una segunda secuencia de ácidos nucleicos. "Complementariedad sustancial" se refiere a hebras de polinucleótidos que presentan aproximadamente al menos un 90% de complementariedad, excluyendo regiones de las hebras de polinucleótidos, tales como salientes, que se seleccionan de esta manera para no ser complementarios. La unión específica requiere un grado

suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a secuencias no diana en condiciones donde se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o de tratamiento terapéutico, o en el caso de ensayos *in vitro*, en las condiciones donde se llevan a cabo los ensayos. Las secuencias no diana pueden diferir normalmente en al menos 5 nucleótidos.

5 "Signos" de enfermedad, como se usa en el presente documento, se refieren de forma amplia a cualquiera anomalía indicativa de enfermedad, descubrible en el examen del paciente; una indicación objetiva de enfermedad, en contraste a un síntoma, que es una indicación subjetiva de enfermedad.

10 "Soporte sólido", "soporte", y "sustrato" como se usa en el presente documento, se refieren de forma amplia a cualquier material que proporciona una estructura sólida o semisólida con la que se puede unir otro material, incluyendo, aunque no de forma limitativa, soportes lisos (*por ejemplo*, metal, vidrio, plástico, silicio, y superficies cerámicas) así como materiales texturados y porosos.

15 "Sujetos" como se usa en el presente documento, se refieren de forma amplia a uno cualquiera adecuado para tratarse de acuerdo con la invención e incluyen, aunque no de forma limitativa, sujetos de aves y mamíferos, y son preferentemente mamíferos. Los mamíferos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, cánidos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, suínidos, roedores (*por ejemplo*, ratas y ratones), lagomorfos, primates, seres humanos. Es adecuado cualquier sujeto mamífero que necesita tratarse de acuerdo con la presente  
20 invención. Los sujetos humanos de ambos géneros y en cualquier etapa de desarrollo (*es decir*, neonatos, niños, menores, adolescentes, adultos) pueden tratarse de acuerdo con la presente invención. La presente invención puede llevarse a cabo también en sujetos animales, particularmente sujetos mamíferos tales como ratones, perros, gatos, ganado, cabras, ovejas, y caballos con fines veterinarios, y para el cribado de fármacos y con objetivos de desarrollo de fármacos. "Sujetos" se usa de manera indistinta con "pacientes".

25 "Síntomas" de una enfermedad, como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a cualquier fenómeno mórbido o desviación de lo normal en la estructura, función, o sensación, experimentada por el paciente e indicativa de enfermedad.

30 "Terapia", "terapéutica", "tratar", o tratamiento, como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a tratar una enfermedad, detener, o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, y/o aliviar la enfermedad, producir la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. La terapia abarca la profilaxis, tratamiento, remedio, reducción, alivio, y/o el proporcionar el alivio de una enfermedad, los signos, y/o los síntomas de una enfermedad. La terapia abarca un alivio de los signos y/o los síntomas en pacientes con signos y/o síntomas de la enfermedad en curso (*por ejemplo*, crecimiento del tumor, metástasis). La terapia abarca también la "profilaxis".  
35 El término "reducido", a fines de la terapia, se refiere de forma amplia a la reducción significativa clínica en los signos y/o síntomas. La terapia incluye tratar las recidivas o los signos y/o síntomas recurrentes (*por ejemplo*, crecimiento del tumor, metástasis). La terapia abarca, aunque no de forma limitativa evitar la aparición de signos y/o síntomas en cualquier momento así como reducir los signos y/o síntomas existentes y eliminar los signos y/o síntomas existentes.  
40 La terapia incluye tratar la enfermedad crónica ("mantenimiento") y la enfermedad aguda. *Por ejemplo*, el tratamiento incluye tratar o prevenir las recidivas o la reincidencia de los signos y/o síntomas (*por ejemplo*, crecimiento del tumor, metástasis).

45 "Región variable" o "VR" como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a los dominios en que cada pareja de cadenas ligera y pesada en un anticuerpo están implicadas directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable ( $V_H$ ) seguido por numerosos dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable ( $V_L$ ) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada.

50 "Vector", como se usa en el presente documento, se refiere de forma amplia a un plásmido, cósmido, fagémido, ADN de fago u otra molécula de ADN que es capaz de replicarse de forma autónoma en una célula hospedadora, y que se caracteriza por uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de la endonucleasa de restricción donde dichas secuencias de ADN se pueden cortar de una manera determinable sin pérdida de una función biológica  
55 esencial del vector, y donde el ADN se puede insertar a fin de producir su replicación y clonación. El vector puede contener además un marcador adecuado para usar en la identificación de las células transformadas con el vector.

Las técnicas y procedimientos se llevan a cabo generalmente de acuerdo con los métodos convencionales bien conocidos en la técnica y según se describen en diversas referencias generales y más específicas que se citan y describen en la totalidad de la presente memoria descriptiva. Véase, *por ejemplo*, Sambrook, et al. (2001) *Molec. Cloning: Lab. Manual* [3ª Ed] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se pueden utilizar técnicas normalizadas para las síntesis de ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejidos, y transformación (*por ejemplo*, electroporación, lipofección). Se pueden llevar a cabo reacciones enzimáticas y técnicas de purificación de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se llevan a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el  
65 presente documento. La terminología utilizada vinculada con, y los procedimientos de laboratorio y las técnicas de, la química analítica, la química orgánica sintética, y la química médica y farmacéutica descritas en el presente

documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la materia. Se pueden utilizar técnicas normalizadas para las síntesis químicas, análisis químicos, preparaciones farmacéuticas, formulaciones, y administración, y tratamiento de pacientes.

## 5 ANTÍGENO A33 QUE COMPRENDE UN EPÍTOPO 31.1

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanizados 31.1. Estos anticuerpos monoclonales humanizados pueden utilizarse en métodos para detectar y tratar el cáncer.

- 10 El anticuerpo 31.1 es un anticuerpo reactivo con tejidos cancerosos de colon humano y cáncer de páncreas. El antígeno del anticuerpo 31.1 es un antígeno A33 humano como se muestra por la transferencia western del antígeno inmunoprecipitado, la espectroscopía de masas, la transferencia por adsorción, la citometría de flujos y ELISA. El anticuerpo 31.1 no reacciona en cruzado con A33 recombinante de ratón en un ELISA de tipo sándwich y A33 en una tinción IHC. El epítipo 31.1 es no lineal debido a la sensibilidad de su perturbación por detergentes y los
- 15 resultados de la unión negativa en condiciones reductoras en la transferencia Western. Se muestran a continuación la secuencia de aminoácidos A33 y los péptidos identificados mediante espectrometría de masas de la proteína IP de células LS174T de tumor de colon humano (inmunoprecipitación).

```

1  MVGKMWPVLW TLCAVRVTVD AIVETPQDV LRSQGKSVI LPCTYHISTS
SREGLIQWDK
61  LLLHTERVV IWPFSNKNYI HGELYKNRVS ISNNAEQSDA SITIDQLTMA DNGTYECSVS
121 LMSDLEGNTK SRVRLVLPV PSKPECGIEG ETHGNNIQL TCQSKEGSPT PQYSWKRYNI
181 LNQEQPLAQP ASGQPVSLKN ISTDTSGYI CTSSNEEGTQ FCNITVAVRS PSMNVALYVG
241 IAVGVVAALI IIGIIYCCC CRGKDDNTED KEDARPNREA YEPEPEQLRE LSREREEDD
301 YRQEEQRSTG RESPDHLDQ (SEQ ID NO:10)

```

- 20 El resultado designa secuencias de péptidos identificadas mediante espectrometría de masas de la IP de 31.1 de LS174T (39% de cobertura de la secuencia A33 total). AS33 es un anticuerpo monoclonal previamente descrito que reacciona con la proteína A33. El anticuerpo 31.1 puede detectar el antígeno en las proteínas IP de 31.1 procedentes de LS174T y una línea de células CHO recombinante diseñada mediante ingeniería genética que expresa la longitud completa del ADNc A33 (A33-CHO), pero no en las proteínas IP de AS33 de ambas líneas de células en la transferencia western en condiciones no reductoras. AS33 se une al antígeno en las proteínas IP de 31.1 y AS33 procedentes de LS 174T y A33 de las células CHO recombinantes. Los resultados experimentales sugieren que el anticuerpo 31.1 se une a un epítipo diferente del antígeno A33 en comparación con el anticuerpo AS33 comercial.
- 25

- 30 Por lo tanto, los anticuerpos 31.1 humanizados descritos en el presente documento pueden reconocer un epítipo no lineal (por ejemplo, conformacional) en el antígeno A33 contenido en la siguiente secuencia peptídica ("epítipo 31.1" que se muestra en negrita):

```

VRLVLPVPSKPECGIEGETIIGNNIQLTCQSKEGSPTPQYSWKRYNILLNQEQPLAQPASGQPVSL
35 K (SEQ. ID. NO. 12).

```

- Además, los datos procedentes del análisis de solapamiento de la matriz de los péptidos 8mer y 10mer y selección por afinidad de la expresión en el fago PH.D sugieren que el epítipo 31.1 en el antígeno A33 puede localizarse alrededor de los restos 168-186 (SPTPQYSWKRYN**ILNQEQP**) (SEQ ID NO:94) de antígeno A33; y se necesita la formación de puentes disulfuro para la conformación del epítipo 31.1 análogo. Estos datos apoyan la divulgación previa en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0031873 que mostró que una mutación puntual diseñada mediante ingeniería genética del ADNc A33 en el resto Asn-179 a Asp redujo la unión del anticuerpo 31.1 tras la transfección en células de mamíferos y la expresión de la proteína A33 recombinante mutada.
- 40

- 45 Por lo tanto, la presente invención proporciona anticuerpos que se unen al antígeno A33 (*por ejemplo*, epítipo 31.1) expresado por los cánceres de colon y páncreas y otros cánceres, y sus usos en procedimientos clínicos y científicos, incluyendo procedimientos diagnósticos. Los anticuerpos NEO-300 que se unen al antígeno A33 (*por ejemplo*, el epítipo 31.1) son útiles como herramientas específicas de dianas diagnósticas y terapéuticas para el cáncer debido a que el anticuerpo NEO-301 inhibió eficazmente la progresión tumoral en un modelo *in vivo*. Además, el antígeno A33 es un biomarcador específico para el cáncer de páncreas, de colon y otros cánceres, y puede medirse en un tejido donde se ha hecho una biopsia así como en el suero del sujeto y en muestras fecales. Además, los estudios de inmunohistoquímica demuestran que los anticuerpos NEO-300 pueden ser útiles como un biomarcador de tejido de la presencia y progresión de cáncer de páncreas y colon humano y puede también identificar otros cánceres tales como los cánceres de útero y de pulmón. véase *también* documento WO
- 50 2011/163401.
- 55

**POLIPÉPTIDOS DEL ANTÍGENO A33**

A33 es un antígeno específico de cáncer. El antígeno A33 es una glicoproteína de la superficie celular expresada en el intestino delgado y el epitelio colónico. El antígeno A33 comparte homología con proteínas asociadas a una unión estrecha de la superfamilia de las inmunoglobulinas incluyendo CAR y JAM. El antígeno A33 se expresa en el 95% de tumores de colon pero no en intestino normal u otros órganos. Ackerman, et al. (2008) Cancer Immunol Immunother 57(7): 1017-1027; Garinchesa, et al. (1996) Int. J. Oncol. 9(3): 465-71.

La invención proporciona anticuerpos humanizados que se unen selectivamente al epítipo 31.1 en el polipéptido del antígeno A33. En la SEQ ID NO:10 se proporcionan polipéptidos ilustrativos que comprenden un antígeno A33. Las secuencias de aminoácidos A33 adicionales derivadas de la proteína A33 de longitud completa incluyen regiones implicadas en la unión del anticuerpo NEO-300 al antígeno A33 (*por ejemplo*, SEQ ID NOS: 10, 11, 12, o 13) debido, como se describe en el presente documento, a que se cree que el epítipo 31.1 no es lineal (*por ejemplo*, conformacional). véase *también* documento WO 2011/163401.

Los ácidos nucleicos que codifican polipéptidos que comprenden al menos un antígeno A33 pueden modificarse utilizando técnicas de biología molecular normalizadas que dan como resultado variantes de polipéptidos que comprende al menos un antígeno A33, incluyendo, aunque no de forma limitativa, deleciones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos, que retienen la antigenicidad específica del antígeno A33 (*por ejemplo*, el antígeno A33 se une mediante el anticuerpo 31.1). Además, las variantes de polipéptidos que comprenden al menos un antígeno A33 pueden retener también la antigenicidad de los antígenos A33 (*por ejemplo*, suscitar una respuesta inmuno-específica contra los antígenos A33, respectivamente, tras la inmunización en un sujeto). Los polipéptidos del antígeno A33 pueden formularse con un transportador farmacéutico para fabricar una composición antigénica útil como una "vacuna contra el cáncer" (*por ejemplo*, una composición farmacéutica que estimula una respuesta inmuno-específica contra el antígeno A33, que produce anticuerpos dirigidos contra el tumor tras la inmunización en un sujeto).

Los polipéptidos del antígeno A33 descritos en el presente documento pueden purificarse a partir de células que se han alterado para expresar este (*por ejemplo*, recombinante). Las secuencias de ADN que codifican los polipéptidos del antígeno A33 pueden insertarse en un vector de expresión y a continuación transformarse (o transfectarse) en una célula hospedadora adecuada y/o expresarse en un animal transgénico. Los polipéptidos del antígeno A33 expresados de esta manera pueden a continuación aislarse mediante métodos conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los polipéptidos de la presente invención pueden sintetizarse bioquímicamente tal como utilizando técnicas de fase sólida normalizada. Estos métodos incluyen síntesis de fase sólida exclusiva, métodos de síntesis de fase sólida parcial, condensación de fragmentos, síntesis clásica de soluciones. Estos métodos se usan preferentemente cuando el péptido es relativamente corto (*es decir*, 10 kDa) y/o cuando no puede producirse mediante técnicas recombinantes (*es decir*, no está codificado por una secuencia de ácido nucleico) y por tanto implica una química diferente. Los procedimientos de síntesis de péptidos de fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente por Stewart (1984) Solid Phase Peptide Syntheses [2ª Ed.] Pierce Chemical Company and Benoit (2005) Chemistry of Peptide Synthesis CRC Press. Los péptidos sintéticos pueden purificarse mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa, y la composición de la cual puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos. Véase Creighton (1992) [2ª Ed.] Proteins, Structures and Molecular Principles W.H. Freeman and Company; Aguilar (2004) [Ed.] HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols Humana Press; Simpson (2002) Protein Sequencing Protocols [2nd Ed.] Humana Press.

En los casos donde se desean grandes cantidades de los polipéptidos de la presente invención, los polipéptidos de la presente invención pueden generarse utilizando técnicas recombinantes tales como las descritas por Invitrogen (2002) "Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) and Insect Culture Techniques" Instruction Manual; Hatti-Kaul y Mattiasson (2003) [Eds] Isolation and Purification of Proteins; Ahmed (2004) Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization CRC Press. Técnicas recombinantes adicionales tales como las descritas por, *por ejemplo*, Bitter, et al. (1987) Methods in Enzymol. 153: 516-544, Studier, et al. (1990) Methods in Enzymol. 185: 60-89, Brisson, et al. (1984) Nature 310: 511-514, Takamatsu, et al. (1987) EMBO J. 6: 307-311, Coruzzi, et al. (1984) EMBO J. 3: 1671-1680 y Brogli, et al. (1984) Science 224: 838-843, Gurley, et al. (1986) Mol. Cell. Biol. 6: 559-565 y Weissbach & Weissbach (1988) Methods for Plant Molecular Biology, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-463.

**Aislamiento de polipéptidos**

La presente invención proporciona también métodos para el aislamiento de los polipéptidos del antígeno A33. *Por ejemplo*, se pueden obtener líneas de células o muestras de tumor relevantes de un paciente de cáncer. Tras la homogeneización y la solubilización en un detergente, el antígeno se purifica cromatográficamente. Se puede usar la cromatografía de exclusión molecular o de afinidad para esto, y se puede usar junto con la unión al anticuerpo NEO-300. *Por ejemplo*, Los polipéptidos del antígeno A33 se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido (*por ejemplo*,



acoplarse a resinas, perlas magnéticas) para una adsorción sencilla del antígeno, lavado, y elución del soporte sólido. La proteína eluida se estudia a continuación adicionalmente para la presencia, caracterización e identificación del antígeno. Véase Walker (2002) Protein Protocols Handbook [2nd Ed.] Humana Press and Cultur (2003) [Ed.] Protein Purification Protocols Humana Press.

5 El antígeno aislado de esta manera se puede usar para preparar un producto farmacéutico utilizando el excipiente farmacéutico convencional y una sustancia transportadora. Por ejemplo, la administración *in-vivo* del antígeno purificado en una solución de NaCl fisiológica.

10 Además, los polipéptidos del antígeno A33 de acuerdo con la invención pueden servir como un antígeno en la identificación de actividades como parte de un cribado de alto rendimiento. Las personas expertas en la materia conocen los métodos de cribado de alto rendimiento. Wells (2002) High Throughout Bioanalytical Sample Preparation Elsevier Health Sciences.

#### 15 LOS ANTICUERPOS NEO-300 SE UNEN AL EPÍTOPO 31.1 EN EL ANTÍGENO A33

La presente invención proporciona anticuerpos humanizados que se unen selectivamente al antígeno A33 incluyendo, aunque no de forma limitativa anticuerpos monoclonales y anticuerpos monoclonales humanizados (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales NEO-300, *por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303). Los anticuerpos que se unen selectivamente al antígeno A33 pueden premezclarse en composiciones con transportadores farmacéuticos y anticuerpos adicionales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales NEO-300, incluyendo, aunque no de forma limitativa NEO-301, NEO-302, NEO-303). Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal NEO-301 presenta especificidad por la unión a células de tumor de colon y páncreas y una fuerte citotoxicidad (*por ejemplo*, actividad ADCC) frente a células de tumor de colon y páncreas. Arlen, et al. (3 de noviembre de 2010) Journal of Cancer 1: 209-222. En la Tabla 1 se proporcionan anticuerpos ilustrativos.

**TABLA 1: Anticuerpos**

Anticuerpo	Alias	Antígeno	SEQ ID NOS ilustrativas	Descripción
NPC-1		NPC-1		hibridoma de murino que expresa NPC-1 IgG1 (ATCC)
NEO-101	NPC-1C, ensituximab	NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 14, 15) CDR de LC (SEQ ID NOS: 16, 17, 18) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 19, 20) CDR de HC (SEQ ID NOS: 21, 22, 23)	anticuerpo NPC-1 quimérico, producido mediante ingeniería genética en el clon 4B7 de la célula de producción CHO-DG44; se dirige a una variante de MUC5AC
NEO-102		NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 24, 25) CDR de LC (SEQ ID NOS: 26, 27, 28) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 29, 30) CDR de HC (SEQ ID NOS: 31, 32, 33)	anticuerpo NPC-1 quimérico, diseñado mediante ingeniería genética en células de producción CHO-M, contiene 2 cambios de aminoácidos en el dominio constante de HC*
NEO-103		NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 34, 35) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 36, 37)	anticuerpo NPC-1 humanizado
16C3		16C3	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 38, 39) CDR de LC (SEQ ID NOS: 40, 41, 42) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 43, 44) CDR de HC (SEQ ID NOS: 45, 46, 47)	hibridoma de murino que expresa 16C3 IgG1 (ATCC)

Anticuerpo	Alias	Antígeno	SEQ ID NOS ilustrativas	Descripción
16C3	Anticuerpos h16C3 variantes	16C3	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 48, 49, 50, 51, 52) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 53, 54, 55, 56, 57)	anticuerpo 16C3 humanizado
NEO-201	h16C3-Abb*	16C3	Cadena ligera (SEQ ID NOS: 58, 59) CDR de LC (SEQ ID NOS: 60, 61, 62) Cadena pesada (SEQ ID NOS: 63, 64)	anticuerpo 16C3 humanizado
			CDR de HC (SEQ ID NOS: 65, 66, 67)	
Anticuerpos NEO-300				
31.1		31.1		Anticuerpo 31.1 quimérico, producido en células CHO-K
NEO-301	31.1C	31.1	Cadena ligera (SEQ ID NO: 68) Cadena pesada (SEQ ID NO: 69)	Anticuerpo 31.1 quimérico, contiene 2 cambios de aminoácidos en el dominio constante de HC,* producido en células CHO-S de alta titulación
NEO-302		31.1	Cadena ligera (SEQ ID NO: 70, 71)	Anticuerpo 31.1 humanizado
			Cadena pesada (SEQ ID NO: 72, 73)	
NEO-303		31.1	Cadena pesada (SEQ ID NOS: 74-77) CDR de HC (SEQ ID NOS: 78 -83) Cadena ligera (SEQ ID NOS: 84-87) CDR de LC (SEQ ID NOS: 88-93)	Anticuerpo 31.1 humanizado
*2 cambios de aminoácidos en el dominio constante de la cadena pesada son Prolina en el resto 175 a Leucina en CH1 y Metionina en el resto 390 a Treonina en CH3. Los restos de leucina y treonina representan más alotipos comunes en la población humana y se introdujeron para reducir la antigenicidad o toxicidad potencial <i>in vivo</i> .				

Los anticuerpos pueden comprender dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas de peso molecular de aproximadamente 23.000 daltons ("cadena ligera"), y dos cadenas pesadas idénticas de peso molecular 53.000-70.000 ("cadena pesada"). Véase Edelman (1971) Ann. NY. Acad. Sci. 190: 5. Las cuatro cadenas se unen mediante enlaces disulfuro en una configuración en "Y" donde las cadenas ligeras soportan las cadenas pesadas comenzando en la boca de la configuración en "Y". La parte de la "rama" de la configuración en "Y" se designa la región F<sub>ab</sub>; La parte del "tallo" de la configuración en "Y" se designa la región F<sub>c</sub>. La orientación de la secuencia de aminoácidos se extiende desde el extremo N terminal en la parte superior de la configuración en "Y" al extremo C terminal en la parte inferior de cada cadena. El extremo N terminal posee la región variable que tiene especificidad por el antígeno que estimuló, y tiene aproximadamente 100 aminoácidos de longitud, existen ligeras variaciones entre la cadena ligera y la cadena pesada y entre anticuerpo y anticuerpo.

La región variable está unida en cada cadena a una región constante que extiende la longitud restante de la cadena y que en una clase particular de anticuerpo no varía con la especificidad del anticuerpo (*es decir*, el antígeno que estimula). Existen cinco clases mayores conocidas de regiones constantes que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina (*por ejemplo*, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE que corresponden a las regiones constantes  $\gamma$ ,  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  de la cadena pesada). La región o clase constante determina una función efectora posterior del anticuerpo, que incluye la activación del complemento (Kabat (1976) Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry [2<sup>a</sup> Ed.] páginas 413-436; Holt, Rinehart, Winston) y otras respuestas celulares (Andrews, et al. (1980) Clinical

Immunobiology 1-18; Kohl, et al. (1983) Immunology 48: 187) mientras que la región variable determina el antígeno con el que esta reaccionará. Las cadenas ligeras se clasifican ya sea como k (kappa) o λ (lambda). Cada clase de cadena pesada puede prepararse tanto con la cadena ligera kappa como con la cadena ligera lambda. Las cadenas ligera y pesada se unen covalentemente entre sí, y las partes de la "cola" de las dos cadenas pesadas se unen entre sí mediante enlaces disulfuro covalentes cuando se generan las inmunoglobulinas tanto mediante hibridomas como mediante linfocitos B.

La unión específica a un anticuerpo en dichas condiciones puede requerir un anticuerpo que se selecciona por su especificidad para una proteína en particular. Por ejemplo, se pueden seleccionar anticuerpos policlonales producidos para la proteína básica seminal de especies específicas tales como rata, ratón, seres humanos para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que sean específicamente inmunorreactivos con la proteína seminal básica y no con otras proteínas, excepto para las variantes y alelos polimórficos de la proteína básica seminal. Se puede conseguir esta selección sustrayendo los anticuerpos que reaccionan en cruzado con otras moléculas de proteínas básicas seminales. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con una proteína en particular. Por ejemplo, los inmunoensayos de ELISA en fase sólida se utilizan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos que son específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, *por ejemplo*, Harlow & Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory, para una descripción de formatos de inmunoensayo y de las condiciones que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica. Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces una señal de fondo o ruido y más normalmente de aproximadamente 10 a 100 veces de fondo.

#### **Anticuerpos policlonales**

Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpos derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. pueden prepararse anticuerpos policlonales que se unen selectivamente al antígeno A33 mediante métodos bien conocidos en la técnica. Véase, *por ejemplo*, Howard y Kaser (2007) Making and Using Antibodies: A Practical Handbook CRC Press.

#### **Anticuerpos monoclonales**

un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos de antígenos, cuya población contiene sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. pueden obtenerse anticuerpos monoclonales mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Kohler y Milstein (1975) Nature 256: 495-497; patente de Estados Unidos n.º 4.376.110; Ausubel, et al. [Eds.] (2011) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY.; y Harlow & Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; Colligan, et al. (2005) [Eds.] Current Protocols in Immunology Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY. Dichos anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina incluyendo IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. un hibridoma productor de un anticuerpo de la presente invención puede cultivarse *in vitro*, *in situ*, o *in vivo*. y el anticuerpo del antígeno A33 que se une selectivamente al antígeno A33 (por ejemplo, la cadena ligera ilustrativa se representa gráficamente en la SEQ ID NO:68 y la cadena pesada se representa gráficamente en la SEQ ID NO:69 y la cadena ligera ilustrativa se representa gráficamente en la SEQ ID NO:70, 71 y la cadena pesada se representa gráficamente en la SEQ ID NO:72, 73). Véase también documento WO 2011/163401. El anticuerpo monoclonal 31.1, descrito en los documentos WO 02/074251 y WO 2006/004950, presenta especificidad por el antígeno A33. El anticuerpo monoclonal 31,1 presenta también especificidad por la unión a células de tumor de colon y páncreas y una fuerte citotoxicidad (*por ejemplo*, actividad ADCC) frente a células de tumor de colon y páncreas. Arlen, et al. (3 de noviembre de 2010) Journal of Cancer 1: 209-222. Un anticuerpo NEO-300 humanizado ilustrativo que se une selectivamente al antígeno A33 (por ejemplo, las cadenas pesadas ilustrativas se representan gráficamente en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74-78 y las cadenas ligeras se representan gráficamente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:84-87).

**Tabla 2: Similitudes por parejas de cadenas pesadas de anticuerpos NEO-301 humanizados**

Para cada alineación por parejas, se proporciona la similitud relativa a la similitud máxima) y el número de aminoácidos idénticos (en % de la secuencia más corta). los valores máximos están subrayados.

	<b>abb31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:75</b>	<b>sdr31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:76</b>	<b>ven31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:77</b>
<b>cdr31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:74</b>	0,985 98%		0,993 98%
<b>abb31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:75</b>			<u>1,000</u> <u>99%</u>
<b>sdr31.1-HC (448 aa) SEQ ID NO:76</b>			0,970 96%

El valor **1.000** de la similitudmarca solo las dos secuencias **más similares**, no significa necesariamente que estas secuencias sean idénticas.

**Tabla 3: Similitudes por parejas de las cadenas ligeras de anticuerpos NEO-301 humanizados**

Para cada alineación por parejas, se proporciona la similitud relativa a la similitud máxima) y el número de aminoácidos idénticos (en % de la secuencia más corta). Los valores máximos están subrayados.

	abb31.1-LC (214 aa) SEQ ID NO:85	sdr31.1-LC (214aa) SEQ ID NO:86	ven31.1-LC (214 aa) SEQ ID NO:87
cdr31.1-LC (214aa) SEQ ID NO:84	0,992 <u>98 %</u>	0,993 <u>98 %</u>	0,986 97 %
abb31.1-LC (214 aa) SEQ ID NO:85		<u>1,000</u> <u>98 %</u>	0,969 96 %
sdr31.1-LC (214aa) SEQ ID NO:86			0,969 95 %

5 Elvalor **1.000** de la similitudmarca solo las dos secuencias **más similares**, no significa necesariamente que estas secuencias sean idénticas.

### Anticuerpos quiméricos

10 Los anticuerpos quiméricos son partes de moléculas diferentes que se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo de murino y una región constante de la inmunoglobulina humana, que se usa principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para disminuir los rendimientos en la producción, por ejemplo, donde los anticuerpos monoclonales murinos tienen mayores rendimientos a partir de hibridomas, de tal manera que se usan anticuerpos monoclonales quiméricos de humano murino. Se conocen en la técnica anticuerpos quiméricos y métodos para su producción. Véase Cabilly, et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 3273-3277; Morrison, et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855, Boulianne, et al. (1984) Nature 312: 643-646; Neuberger, et al. (1985) Nature 314: 268-270; Solicitud de patente europea 173494 (1986); WO 86/01533 (1986); Solicitud de patente europea 184187 (1986); Solicitud de patente europea 73494 (1986); Sahagan, et al. (1986) J. Immunol. 137: 1066-1074; Liu, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443; Sun, et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218; Better, et al. (1988) Science 240: 1041-1043; y Harlow & Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory; Patente de Estados Unidos 5.624.659. Los anticuerpos quiméricos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, NEO-301 (31.1C) que se une selectivamente al antígeno A33 (por ejemplo, la cadena ligera ilustrativa se representa gráficamente en la SEQ ID NO:68 y la cadena pesada se representa gráficamente en la SEQ ID NO:69). Véase también documento WO 2011/163401.

### Anticuerpos humanizados

30 Los anticuerpos humanizados se diseñan mediante ingeniería genética para contener cuántos más dominios de inmunoglobulina análogos a humanos, e incorporan solo las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo derivado de animal. Esto se puede llevar a cabo examinando la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajustándolas a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 6.187.287. Del mismo modo, Se conocen ahora bien en la técnica otros métodos para producir anticuerpos humanizados. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; 6.054.297; 6.180.370; 6.407.213; 6.548.640; 6.632.927; y 6.639.055; Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; Reichmann, et al. (1988) Nature 332: 323-327; Verhoeyen, et al. (1988) Science 239: 1534-36; y Zhiqiang An (2009) [Ed.] Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic John Wiley & Sons, Inc. Los ejemplos de anticuerpos humanizados incluyen, aunque no de forma limitativa NEO-302 que se une selectivamente al antígeno A33 (por ejemplo, la cadena ligera ilustrativa se representa gráficamente en las SEQ ID NO: 70 -71 y la cadena pesada se representa gráficamente en las SEQ ID NO: 72-73 y NEO-303 que se une selectivamente al antígeno A33 ( por ejemplo, la cadena ligera ilustrativa se representa gráficamente en las SEQ ID NO:74 -77 con las secuencias de la CDR de la cadena pesada de las SEQ ID NOS: 78-83 y la cadena pesada se representa gráficamente en las SEQ ID NO:84-8) con las secuencias de la CDR de la cadena ligera de las SEQ ID NOS: 88-93).

### Fragmentos de anticuerpos

50 Además de las inmunoglobulinas completas (o sus equivalentes recombinantes), se pueden sintetizar fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión al epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, u otros fragmentos). "Fragmento", o se pueden diseñar inmunoglobulinas mínimas utilizando técnicas de inmunoglobulinas recombinantes. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" para uso en la presente invención pueden producirse sintetizando una región variable de la cadena ligera fusionada y una región variable de la cadena pesada. Son también de interés las combinaciones de anticuerpos, por ejemplo, los diacuerpos, que comprenden dos

especificidades de Fv distintas. Los fragmentos de unión a antígeno de las inmunoglobulinas incluyen, aunque no de forma limitativa SMIP (productos inmunofarmacéuticos de moléculas pequeñas), camelbodies, nanocuerpos, e IgNAR.

### 5 **Anticuerpos antiidiotípicos**

Un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Se puede preparar un anticuerpo Id inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (*por ejemplo*, cepa de ratón) como la fuente del anticuerpo para el cual se prepara una anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo para estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véanse *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos 4.699.880. el anticuerpo anti-Id puede utilizarse también como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal adicional, produciendo un anticuerpo anti-anti-Id así denominado. El anticuerpo anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo original que indujo el anti-Id. Por lo tanto, utilizando anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un anticuerpo es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos especificidad idéntica. Véase el documento WO 2011/163401.

### **Anticuerpos diseñados y modificados mediante ingeniería genética**

Un anticuerpo de la invención puede prepararse además utilizando un anticuerpo que tiene una o más de las secuencias VH y/o VL derivadas de un material de partida del anticuerpo para diseñar mediante ingeniería genética un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas procedentes del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética modificando uno o más restos en una o ambas regiones variables (*es decir*, VH y/o VL), *por ejemplo*, en una o más regiones CDR y/o en una o más regiones marco. De manera adicional o alternativa, un anticuerpo puede diseñarse mediante ingeniería genética modificando resto en la(s) región(es) contante(s), *por ejemplo*, para alterar la(s) función(es) efectora(s) del anticuerpo.

Un tipo de región variable diseñada mediante ingeniería genética que se puede llevar a cabo es el injerto de la CDR. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de restos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones determinantes de la complementariedad de la cadena pesada y la cadena ligera (CDR). Por este motivo, Las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de la CDR son responsables de la mayoría de interacciones antígeno-anticuerpo, Es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de los anticuerpos específicos de origen natural construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias de la CDR procedentes del anticuerpo específico de origen natural injertado sobre las secuencias marco de un anticuerpo diferente con propiedades diferentes. Véanse, *por ejemplo*, Riechmann, et al. (1998) Nature 332: 323-327; Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; Queen, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. U.S.A. 86: 10029-10033; Patentes de Estados Unidos 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370.

Pueden obtenerse secuencias marco adecuadas de bases de datos de ADN públicas o referencias publicadas que incluyen secuencias gónicas de la línea germinal del anticuerpo. *Por ejemplo*, pueden encontrarse secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera humanas en la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH N.º 91-3242; Tomlinson, et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, et al. (1994) Eur. J Immunol. 24: 827-836.

Otro tipo de modificación de una región variable es mutar los restos de aminoácidos en las regiones CDR1, CDR2 y/ CDR3 de VH y/o VL para mejorar por tanto una o más propiedades de unión (*por ejemplo*, afinidad) del anticuerpo de interés. Se pueden llevar a cabo la mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por la PCR para introducir la(s) mutación(es) y se puede evaluar el efecto sobre la unión del anticuerpo u otras propiedades funcionales de interés, en ensayos adecuados *in vitro* o *in vivo*. Se pueden introducir preferentemente modificaciones conservativas (como se describe en el presente documento). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos, pero son preferentemente sustituciones. Además, normalmente no se alteran más de un, dos, tres, cuatro o cinco restos en una región CDR.

Los anticuerpos diseñados mediante ingeniería genética de la invención incluyen aquellos donde se han realizado modificaciones de los restos marco en VH y/o VL, *por ejemplo*, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Normalmente, dichas modificaciones del marco se realizan para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. *Por ejemplo*, una solución es "retromutar" uno o más restos marco en la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha experimentado una mutación somática puede contener restos marco que difieren de la secuencia de la línea germinal a partir de la cual se deriva el anticuerpo. Dichos restos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal a partir de las cuales se deriva el anticuerpo.

- Además, o de forma alternativa a las modificaciones realizadas en las regiones marco o CDR, los anticuerpos de la invención pueden diseñarse mediante ingeniería genética para incluir modificaciones en la región Fc, normalmente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, tal como la semivida en suero, la fijación del complemento, la unión al receptor de Fc, y/o la citotoxicidad celular dependiente del antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, pueden unirse uno o más restos químicos al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, para alterar de nuevo una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Dichas realizaciones se describen además a continuación. La numeración de restos en la región Fc es la del índice de la UE de Kabat.
- 5
- 10 La región bisagra de CH1 puede estar modificada de tal manera que el número de restos de cisteína en la región bisagra está alterado, *por ejemplo*, aumentado o disminuido. véase la patente de Estados Unidos n.º. 5.677.425. El número de restos de cisteína en la región bisagra de CH1 puede estar alterado para, por ejemplo, facilitar el ensamblaje de las cadenas ligera y pesada o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.
- 15 La región bisagra de Fc de un anticuerpo puede estar mutada para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se pueden introducir una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfase del dominio CH2-CH3 del fragmento bisagra-Fc ha dañado la unión de la proteína A de *Staphylococcus* (SpA) con respecto a la unión Spa del dominio bisagra de Fc nativo. Véase, *por ejemplo*, Patente de Estados Unidos 6.165.745.
- 20 El anticuerpo puede modificarse para aumentar su semivida biológica. Son posibles varias estrategias. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F. véase la patente de Estados Unidos n.º. 6.277.375. Como alternativa, para aumentar la semivida biológica, puede alterarse el anticuerpo en la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión a un receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG. Véanse patentes de Estados Unidos números 5.869.046 y 6.121.022.
- 25 La región Fc puede estar alterada sustituyendo al menos un resto de aminoácido con un resto de aminoácido diferente para alterar la(s) función(es) efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados entre los restos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden estar sustituidos con un resto de aminoácido diferente de tal manera que el anticuerpo tiene una afinidad alterada por un ligando efector, pero retiene la capacidad de unión del antígeno del anticuerpo precursor. el ligando efector al cual puede alterarse la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor de Fc del componente C1 del complemento. Véanse las patentes de Estados Unidos números 5.624.821 y 5.648.260.
- 30 La región Fc puede modificarse para aumentar la capacidad del anticuerpo de mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de Fcγ modificando uno o más restos de aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 330, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Véase el documento WO 00/42072. Además, se han cartografiado los sitios de unión en la IgG1 humana para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcγRn y las variantes con unión mejorada. Véase Shields, et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604. se muestran las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 para mejorar la unión a FcγRIII. Además, se muestran las siguientes combinaciones de mutantes para mejorar la unión a FcγRIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.
- 35
- 40
- 45 La glicosilación de un anticuerpo puede estar modificada. Por ejemplo, puede prepararse un anticuerpo aglicosilado (*es decir*, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse para, por ejemplo, aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono pueden llevarse a cabo, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación en la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, Se pueden realizar una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de los sitios de glicosilación de uno o más marcos de la región variable para eliminar por tanto la glicosilación en este sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, *por ejemplo*, patentes de Estados Unidos con números 5.714.350 y 6.350.861.
- 50
- 55 De manera adicional o alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tenga cantidades reducidas de restos fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNac bisectantes aumentadas. Se ha demostrado que dichos modelos de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono pueden llevarse a cabo, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. Se han descrito en la técnica células con una maquinaria de glicosilación alterada y se pueden usar como células hospedadoras donde expresan anticuerpos recombinantes de la invención para producir por tanto un anticuerpo con glicosilación alterada. Véanse publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º. 2004/0010704 y Yamane-Ohnuki, et al. (2004) Biotechnol Bioeng. 87: 614-22; documentos EP 1.176.195; WO 2003/035835; Shields, et al. (2002) J. Biol. Chem. 277: 26733-26740; WO 99/54342; Umana, et al. (1999) Nat. Biotech. 17: 176-180; y Tarentino, et al. (1975) Biochem. 14: 5516-23.
- 60
- 65

Un anticuerpo puede estar pegilado para, por ejemplo, aumentar la semivida biológica (por ejemplo, en suero) del anticuerpo. Para pegar un anticuerpo, el anticuerpo, o un fragmento de anticuerpo del mismo, se hace reaccionar normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o aldehído derivado de PEG, en condiciones donde uno o más grupos de PEG llegan a unirse al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Preferentemente, la pegilación se lleva a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula de PEG reactiva (o un polímero soluble en agua de un reactivo análogo).

La invención proporciona también variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, diacuerpos, SMIP, camelbodies, nanocuerpos, IgNAR, polipéptidos, regiones y las CDR que se muestran en el presente documento. Estas pueden contener, *por ejemplo*, mutaciones de sustituciones conservativas, (*es decir*, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, la sustitución conservativa se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro en la misma clase general, *por ejemplo*, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico, o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro.

### Métodos de diseñar mediante ingeniería genética anticuerpos

Se pueden usar anticuerpos que tengan secuencias de VH y VL divulgadas en el presente documento para crear nuevas variantes de anticuerpos modificando las secuencias VH y/o VL, o la(s) región(es) constante(s) unidas a las anteriores. Por lo tanto, las características estructurales de una variante de anticuerpo de la invención, se usan para crear variantes de anticuerpos relacionadas estructuralmente que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tal como la unión al antígeno A33. Por ejemplo, una o más regiones CDR de una variante del anticuerpo NEO-300, o las mutaciones de las mismas, pueden combinarse de forma recombinante con regiones marco conocidas y/u otras CDR para crear anticuerpos NEO-300 adicionales, diseñados de forma recombinante mediante ingeniería genética (*por ejemplo*, anticuerpos que se unen al antígeno A33 *por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) de la invención, como se describe en el presente documento. el material de partida para el método de diseño mediante ingeniería genética puede ser una o más de las secuencias VH y/o V<sub>k</sub> proporcionadas en el presente documento, o una o más de las regiones CDR del mismo. Para crear el anticuerpo diseñado mediante ingeniería genética, no es necesario preparar realmente (*es decir*, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias VH y/o V<sub>k</sub> proporcionadas en el presente documento, o una o más regiones CDR del mismo. En su lugar, la información contenida en la(s) secuencia(s) se utiliza como el material de partida para crear secuencia(s) de "segunda generación" derivadas de las secuencia(s) originales y a continuación la(s) secuencia(s) de segunda generación se prepara(n) y expresa(n) como una proteína. Se pueden usar técnicas de biología molecular normalizadas para preparar y expresar la secuencia del anticuerpo alterado.

El anticuerpo codificado por la(s) secuencia(s) del anticuerpo alterado puede retener una, alguna o todas las propiedades funcionales de los anticuerpos NEO-300 (por ejemplo NEO-301, NEO-302, NEO-303) producidos mediante métodos y con secuencias proporcionadas en el presente documento, con propiedades funcionales que incluyen la unión a la variante del antígeno A33 con un nivel de K<sub>D</sub> específico o menor y/o modular la actividad inmunocelular, y/o unirse selectivamente a las células diana deseadas tales como, por ejemplo, carcinoma colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de ovario, cáncer gástrico, y cáncer de hígado. pueden evaluarse las propiedades funcionales de los anticuerpos alterados utilizando ensayos normalizados disponibles en la técnica y/o descritos en el presente documento.

Se pueden introducir mutaciones de forma aleatoria o selectiva junto con toda o parte de una secuencia de codificación de un anticuerpo NEO-300 y se pueden cribar los anticuerpos NEO-300 o modificados resultantes para la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales deseadas. Véanse los documentos WO 2002/092780 y WO 2003/074679.

### Generación de anticuerpos NEO-300 utilizando animales

Los anticuerpos de la invención que se unen selectivamente al antígeno A33 pueden ser anticuerpos monoclonales humanos (por ejemplo, NEO-302 y NEO-303). Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra un antígeno A33 pueden generarse utilizando partes que transportan ratones transgénicos o transcromosómicos del sistema inmunitario humano más bien que del sistema del ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados en el presente documento HuMAb Mouse® y KM Mouse®, y se denominan es su conjunto en el presente documento "ratones con Ig humana" El HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contiene miniloci de los genes de la inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de la inmunoglobulina de la cadena pesada (□ y □) y la cadena ligera □, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci endógenos de la cadena □ y □□. Véase, *por ejemplo*, Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859. Por consiguiente, Los ratones presentan una expresión reducida de la IgM de ratón □, y, en respuesta a la inmunización, los transgenes de la cadena pesada y la cadena ligera introducidos experimentan un cambio de clase y mutación somática para generar una alta afinidad por la IgG□ monoclonal humana. Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg y Huszar (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546. La preparación y el uso del HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas transportadas por dicho ratón, se describen adicionalmente en Taylor, et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, et al. (1993)

International Immunology 5: 647-656; Tuailleon, et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 3720-3724; Choi, et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailleon, et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véanse además, las patentes de Estados Unidos números 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; los documentos WO 92/03918, los documentos WO 93/12227, WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962; y WO 01/14424.

los anticuerpos NEO-300 humanos (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) de la invención pueden generarse utilizando un ratón que transporta secuencias de la inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, Dicho ratón transporta un transgén de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en el presente documento "KM mice®", se describen en detalle en el documento WO 02/43478.

Aún más, están disponibles en la técnica sistemas animales transgénicos alternativos que expresan los genes de la inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos NEO-300 de la invención. Por ejemplo, Se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.

Además, Están disponibles en la técnica sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan los genes de la inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos NEO-300 de la invención. Por ejemplo, se pueden usar ratones que transportan un transcromosoma de la cadena pesada humana y un transcromosoma de la cadena ligera humana, denominados "ratones TC". Véase Tomizuka, et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas que transportan transcromosomas de la cadena pesada y la cadena ligera humana (Kuroiwa, et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894) y se pueden usar para generar anticuerpos NEO-300 de la invención.

Se pueden preparar también anticuerpos monoclonales humanos de la invención utilizando métodos de expresión en fagos para cribar bibliotecas de genes de la inmunoglobulina humana. Dichos métodos de expresión en fagos para aislar anticuerpos humanos están establecidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908; 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención pueden prepararse también utilizando ratones SCID donde se han reconstituido células inmunitarias humanas de tal manera que se puede generar una respuesta de anticuerpos humanos tras la inmunización. Véanse, por ejemplo, patentes de Estados Unidos con números 5.476.996 y 5.698.767.

Cuando se utilizan ratones con Ig humana para generar los anticuerpos humanos de la invención, dichos ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de un polipéptido del antígeno A33, como se describe por Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; documentos WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferentemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad tras la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 µg) A33 para inmunizar ratones con Ig humana intraperitonealmente.

Antes de experimentar con diversos antígenos por otros ha mostrado que los ratones transgénicos responden cuando se inmunizan inicialmente de forma intraperitoneal (IP) con antígenos en adyuvante completo de Freund, seguido por inmunizaciones IP en semanas alternas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, se encuentra también que son eficaces otros adyuvantes diferentes del de Freund. Asimismo, se encuentra que las células completas en ausencia de adyuvante son muy inmunógenas. La respuesta inmunitaria puede vigilarse durante el curso del protocolo de inmunización obteniéndose muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede cribarse mediante ELIS (como se describe a continuación) y se pueden utilizar ratones con suficientes títulos inmunoglobulina humana NEO-300 para las fusiones. Los ratones se pueden reforzar por vía intravenosa 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo. Se espera que puedan necesitarse llevar a cabo 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones se inmunizaron normalmente por cada antígeno. Normalmente, se usaron cepas HCo7 y HCo12. Asimismo, los transgenes HCo7 y HCo12 pueden reproducirse conjuntamente en un único ratón que tiene dos diferentes transgenes de la cadena pesada humana (HCo7/HCo12). de forma alternativa o adicional, se puede usar la cepa KM Mouse®.

#### **Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos de la invención**

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar esplenocitos y o células de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse con una línea de células inmortalizadas adecuada, tales como una línea de células de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígenos. Por ejemplo, se pueden fusionar suspensiones monocelulares de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados a un sexto del número de células de mieloma de ratón no secretoras de P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células se pueden sembrar en



placas a aproximadamente  $2 \times 10^{-5}$  en placas de microvaloración de fondo plano, seguido por una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de clon fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina, 50 mg/ml de gentamicina y 1X HAT (Sigma; el HAT se añade 24 horas después de la fusión). Tras aproximadamente dos semanas, las células se pueden cultivar en medio donde el HAT se sustituye con HT. A continuación se pueden cribar pocillos individuales mediante ELISA para los anticuerpo IgM e IgG monoclonales humanos. Una vez que se produce el crecimiento en extensión del hibridoma, se puede observar el medio usualmente después de 10-14 días. Los hibridomas secretores de anticuerpos se pueden volver a sembrar, cribarse de nuevo, y si son todavía positivos para la IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden subclonarse al menos dos veces mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

Para purificar anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden hacerse crecer en matraces giratorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa (Pharmacia, Piscataway, N.J.) Se puede comprobar la IgG eluida mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución tampón puede intercambiarse en PBS y la concentración puede determinarse mediante la DO280 usando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden distribuirse en alícuotas y almacenarse a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### POLINUCLEÓTIDOS QUE CODIFICAN ANTICUERPOS NEO-300

La presente invención proporciona también nucleótidos cuyos anticuerpos NEO-300 se describen en el presente documento. La invención proporciona también polinucleótidos que comprenden al menos una secuencia de anticuerpos NEO-300 que codifica polipéptidos similares con diferente utilización del codón, secuencias alteradas caracterizadas por mutaciones, tales como deleciones, inserciones o sustituciones de uno o más nucleótidos, tanto de origen natural como inducidos por el hombre, tanto de forma aleatoria como en una manera dirigida. La presente invención abarca también secuencias de ácidos nucleicos homólogas (por ejemplo, que forman parte de una secuencia de polinucleótidos de la presente invención), que incluye regiones de secuencias únicas en los nucleótidos de la presente invención.

La presente invención proporciona también métodos para producir anticuerpos, y fragmentos de los mismos. Los métodos de producir anticuerpos son bien conocidos de aquellas personas normalmente expertas en la materia. Por ejemplo, se conocen ahora bien en la técnica los métodos para producir anticuerpos quiméricos. Véanse, por ejemplo, patente de Estados Unidos n.º 4.816.567; Morrison, et al. (1984) PNAS USA 81: 8651-55; Neuberger, et al. (1985) Nature 314: 268-270; Boulianne, et al. (1984) Nature 312: 643-46.

Por ejemplo, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno pueden producirse mediante ingeniería genética. En esta técnica, como con otros métodos, las células productoras de anticuerpos se sensibilizan para el antígeno o inmunógeno deseado. El ARN mensajero aislado de las células productoras de anticuerpos se utiliza como un molde para preparar el ADNc utilizando la amplificación de la PCR. Una biblioteca de vectores, conteniendo cada uno un gen de la cadena pesada y un gen de la cadena ligera que retienen la especificidad inicial del antígeno, se produce mediante inserción de las secciones adecuadas del ADNc de la inmunoglobulina amplificada en los vectores de expresión. Se construyó una biblioteca combinatoria combinando la biblioteca de genes de cadena pesada con la biblioteca de genes de cadena ligera. Esto da como resultado una biblioteca de clones que expresa simultáneamente una cadena pesada y ligera (que se asemeja al fragmento Fab o al fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo). Los vectores que transportan estos genes se transfectan simultáneamente en una célula hospedadora. Cuando se induce la síntesis del gen del anticuerpo en el hospedador transfectado, las proteínas de la cadena pesada y ligera se autoensamblan para producir anticuerpos activos que se pueden detectar cribando con el antígeno o inmunógeno.

Otro aspecto de la invención pertenece a las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos de la invención que se unen al antígeno A33. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisado celular, o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico puede aislarse mediante purificación separado de otros componentes celulares u otros contaminantes (por ejemplo, otros ácidos nucleicos o proteínas celulares) mediante técnicas normalizadas, incluyendo tratamiento alcalino/con SDS, formación de bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica. Véase Ausubel, et al. (2011) Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. El ácido nucleico puede ser una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse utilizando técnicas de biología molecular normalizadas. Para los anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos que transportan genes de la inmunoglobulina humana como se describe adicionalmente a continuación), los ADNc que codifican las cadenas ligera y pesada del anticuerpo fabricado por el hibridoma pueden obtenerse mediante amplificación de la PCR normalizada o técnicas de clonación del ADN. Para los anticuerpos obtenidos a partir de

una biblioteca de genes de inmunoglobulinas (utilizando, por ejemplo, técnicas de expresión en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse a partir de la biblioteca.

Específicamente, se pueden conseguir sustituciones de codones degeneradas generando, *por ejemplo*, secuencias donde la tercera posición de uno o más codones seleccionados se sustituye con restos de base mixta y/o desoxiinosina. Batzer, et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka, et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-08; Rossolini, et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8: 91-98.

Una vez que se obtienen los fragmentos de ADN que codifican los segmentos de VH y VL, estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente mediante técnicas de ADN recombinante normalizadas, para convertir, por ejemplo, los genes de la región variable en genes de la cadena del anticuerpo de longitud completa, genes del fragmento Fab, o un gen de un scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH se une operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un enlazador flexible.

El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa uniéndose operativamente el ADN que codifica VH con otra molécula de ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Se conocen en la técnica las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada humana (*véanse, por ejemplo*, Kabat, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH n.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación de la PCR normalizada. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM, o IgD, pero de forma más preferente es una región constante de IgG1 o IgG4. Para un gen de la cadena pesada de un fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede unirse operativamente con otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de la cadena pesada.

El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de la cadena ligera (así como en un gen de la cadena ligera de Fab) unido operativamente al ADN que codifica VL de otra molécula de ADN que codifica la región constante de la cadena ligera, CL. Se conocen en la técnica las secuencias de los genes de la región constante de la cadena ligera humana (*véanse, por ejemplo*, Kabat, et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest* Quinta Edición, U.S. Department of Health and Human Services, Publicación NIH n.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones pueden obtenerse mediante amplificación de la PCR normalizada. La región constante de la cadena ligera puede ser la región constante kappa o lambda, pero más preferentemente es una región constante kappa.

Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se unen operativamente a otro fragmento que codifica un enlazador flexible, *por ejemplo*, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly4-Ser)<sub>3</sub>, de tal manera que las secuencias VH y VL pueden expresarse como una proteína monocatenaria contigua, con las regiones VL y VH unidas por el enlazador flexible. *Véanse, por ejemplo*, Bird, et al. (1988) *Science* 242: 423-426; Huston, et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883; McCafferty, et al. (1990) *Nature* 348: 552-554.

La presente invención abarca también ácidos nucleicos que codifican homólogos de los polipéptidos del anticuerpo NEO-300, dichos homólogos pueden ser al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% homólogos idénticos a las secuencias de aminoácidos que se muestran en el presente documento, como puede determinarse usando el software BlastP del National Center of Biotechnology Information (NCBI) usando parámetros por defecto. La presente invención abarca también fragmentos de los polinucleótidos y polipéptidos anteriormente descritos que tienen mutaciones, tales como deleciones, inserciones o sustituciones de uno o más ácidos nucleicos, tanto de origen natural como inducidos por el hombre, tanto de forma aleatoria como en una manera dirigida.

Las moléculas de ácidos nucleicos pueden codificar un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303), o un fragmento funcional de dicha molécula de ácido nucleico. Un "fragmento funcional" de dicho ácido nucleico incluye un fragmento del gen o ADNc que codifica dicho anticuerpo NEO-300, cuyo fragmento es capaz de expresarse para producir un anticuerpo NEO-300 capaz de unirse al antígeno A33. Por lo tanto, por ejemplo, fragmentos del anticuerpo NEO-300 de acuerdo con la invención que corresponde a restos de aminoácidos que contribuyen a la unión con el antígeno A33. Este aspecto de la invención incluye también isoformas cortadas y empalmadas diferencialmente e inicios de la transcripción de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención comprenden también fragmentos, derivados y variantes alélicas de las moléculas de ácidos nucleicos descritas anteriormente que codifican un anticuerpo NEO-300 de acuerdo con la invención. Son bien conocidos en la técnica los métodos y materiales para preparar ácidos nucleicos que codifican fragmentos de anticuerpos NEO-300. *Véanse, por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Los anticuerpos, y fragmentos de los mismos, de la invención pueden también producirse construyendo, usando técnicas convencionales bien conocidas de aquellas personas normalmente expertas en la materia, un vector de expresión que contiene un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena pesada de anticuerpo donde la

secuencia de ADN que codifica las CDR requeridas para la especificidad del anticuerpo se deriva de una fuente de células no humana, mientras que la secuencia de ADN que codifica las partes restantes de la cadena de anticuerpo se deriva de una fuente de células humana. Además, la invención se refiere a vectores, especialmente plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores comunes en ingeniería genética, que contienen las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente mencionadas de la invención. Las moléculas de ácidos nucleicos contenidas en los vectores pueden unirse a elementos reguladores que aseguran la transcripción en células procariontas y eucariotas.

Además, identidad se refiere de forma amplia a la de la equivalencia funcional y/o estructural que existe entre las moléculas de ácidos nucleicos afectadas o las proteínas codificadas por ellos. Las moléculas de ácidos nucleicos, que son homólogas a las moléculas descritas anteriormente y constituyen derivados de estas moléculas, son generalmente variaciones de estas moléculas, que constituyen modificaciones, que ejecutan la misma función biológica. Al mismo tiempo, las variaciones pueden producirse naturalmente, por ejemplo, pueden ser secuencias de otras especies, o pueden ser mutantes, donde estos mutantes pueden haberse producido de manera natural o se han introducido mediante mutaciones de objetivos. Las variaciones pueden ser también secuencias fabricadas sintéticamente. Las variaciones pueden ser variantes de origen natural y también variantes fabricadas sintéticamente o variantes producidas mediante técnicas de ADN recombinante. Las moléculas de ácidos nucleicos, que se desvían de las moléculas de ácidos nucleicos de acuerdo con la invención debido a la degeneración del código genético, constituyen una forma especial de derivados.

Incluida también en el alcance de la invención está cualquier secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos del anticuerpo NEO-300 del mismo. Debido a que el código genético está degenerado, se puede usar más de un codón para codificar un aminoácido concreto. Utilizando el código genético, se pueden identificar uno o más nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales sería capaz de codificar el aminoácido. La probabilidad de que un nucleótido concreto constituirá, de hecho, la secuencia real de codificación del codón puede estimarse considerando las relaciones anómalas de emparejamiento de bases y la frecuencia con la que un codón concreto se utiliza realmente (para codificar un aminoácido concreto) en células eucariotas o procariontas que expresan un antígeno A33 de las mismas. Dichas "reglas de utilización del codón" se divulgan por Lathe, et al. (1985) J. Molec. Biol. 183: 1-12.

El aislamiento y la expresión del anticuerpo NEO-300 o los fragmentos o variantes del mismo (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303), de la invención puede efectuarse mediante procedimientos de clonación bien establecidos, usando sondas o cebadores construidos basándose en las secuencias de ácidos nucleicos del anticuerpo NEO-300 divulgadas en la solicitud. Las secuencias del anticuerpo NEO-300 relacionadas pueden también identificarse a partir de bases de datos genómicas de ser humano u otras especies utilizando las secuencias divulgadas en el presente documento y tecnología de búsqueda basadas en ordenador conocidas, *por ejemplo*, búsqueda de la secuencia BLAST. Los pseudogenes divulgados en el presente documento pueden utilizarse para identificar alelos funcionales o genes relacionados.

Se pueden usar a continuación vectores de expresión para infectar o transfectar células hospedadoras para la expresión funcional de estas secuencias. Estos genes y vectores se pueden preparar y expresar *in vitro* o *in vivo*. Un experto reconocerá que se pueden obtener los fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de los ácidos nucleicos modulando la expresión o la actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores) en los vectores de la invención. Se pueden usar cualquiera de los métodos descritos para aumentar o disminuir la expresión o la actividad.

Se pueden generar las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica tal como la síntesis o síntesis en fase sólida. El equipo y los reactivos para ejecutar la síntesis en fase sólida están comercialmente disponibles de, por ejemplo, Applied Biosystems. Se puede emplear también cualquier otro medio para dicha síntesis; la síntesis real de los polinucleótidos está bien comprendida en las capacidades de los expertos en la materia. Véanse, *por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; Swamy (2008) Laboratory Manual on Biotechnology Rastogi Publications; Herdewijn (2005) [Ed.] Methods in Molecular Biology: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications Volumen 288 Humana Press; y Rapley (2000) [Ed.] The Nucleic Acid Protocols Handbook Humana Press. A continuación pueden obtenerse fragmentos de ADN bicatenario tanto sintetizando la hebra complementaria e hibridando las hebras juntas en condiciones adecuadas, como añadiendo la hebra complementaria utilizando la ADN polimerasa con una secuencia de cebador adecuada.

Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en las secuencias, subclonación, marcado de sondas, secuenciación, están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes que se describen ampliamente en la patente y en la bibliografía científica. Véanse, *por ejemplo*, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) Ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Tijssen (1993) [Ed.] Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation, Elsevier, NY.

La hibridación y la fuerza de hibridación (por ejemplo, la fuerza de la asociación entre polinucleótidos) se ve afectada por muchos factores bien conocidos en la técnica, incluyendo el grado de complementariedad entre los

polinucleótidos y el rigor de las condiciones implicadas, que se ve afectado por dichas condiciones como la concentración de sales, la presencia de otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de polietilenglicol), la molaridad de las hebras en hibridación y el contenido de G+C de las hebras de polinucleótidos, todo lo cual da como resultado una temperatura de fusión característica ( $T_m$ ) de híbrido formado. Se divulgan las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos por Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory, y por Haynes, et al. (1985) en *NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH* (IRL Press, DC). Las condiciones de lavado de la hibridación pueden incluir solución de lavado de 0,2 x SSC/SDS al 0,1% e incubación con rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente, (lavado de rigor bajo), la solución de lavado de 0,2 x SSC/SDS al 0,1% precalentada (42°C) y la incubación con rotación durante 15 minutos a 42°C (lavado de rigor medio) y la solución de lavado de 0,1 x SSC/SDS al 0,1% (68°C) e incubación con rotación durante 15 minutos a 68°C (lavado de rigor alto). Véase Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.

Se pueden usar cebadores de oligonucleótidos para amplificar los ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303). Se pueden clonar también los ácidos nucleicos descritos en el presente documento o medirse cuantitativamente utilizando técnicas de amplificación. Son bien conocidos en la técnica los métodos de amplificación, e incluyen, *por ejemplo*, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis (1990) [Ed.] *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY.; Innis (1995) [Ed.] *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., NY.); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu (1989) *Genomics* 4: 560; Landegren (1988) *Science* 241: 1077; Barringer (1990) *Gene* 89: 117); amplificación mediante transcripción (Kwoh (1989) *PNAS* 86: 1173); replicación de secuencias autosostenida (Guatelli (1990) *PNAS* 87: 1874); amplificación de la replicasa Q Beta (Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35: 1477-91); ensayo automatizado de amplificación de la replicasa Q-beta (Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10: 257-71); y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (*por ejemplo*, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). Véanse, *además*, Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 307-16; Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; patentes de Estados Unidos números 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13: 563-64.

se conocen bien en la técnica los paradigmas para diseñar parejas de cebadores degenerados. Por ejemplo, un programa informático de estrategia CONsensus-DEgenerate Hybrid Oligonucleotide Primer (CODEHOP) está fácilmente accesible y se une directamente al sitio de alineación de secuencias múltiples BlockMaker para la predicción del cebador híbrido que comienza con un conjunto de secuencias de proteínas relacionadas, tal como las secuencias del anticuerpo NEO-300 proporcionadas en el presente documento. Véanse, *por ejemplo*, Rose (1998) *Nucleic Acids Res.* 26: 1628-35; Singh (1998) *Biotechniques* 24: 318-19.

Las variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecies que son sustancialmente idénticos a los anticuerpos NEO-300 divulgados en el presente documento pueden aislarse utilizando las sondas de ácidos nucleicos descritas en el presente documento. Como alternativa, se pueden usar bibliotecas de expresión para clonar polipéptidos del anticuerpo NEO-300 y las variantes polimórficas, alelos, y homólogos interespecies de los mismos, detectando homólogos expresados inmunológicamente con antiseros o anticuerpos purificados preparados frente a un polipéptido del antígeno A33, que también reconoce y se une selectivamente al homólogo del antígeno A33.

Los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo NEO-300 pueden generarse mediante amplificación (*por ejemplo*, PCR) de secuencias de ácidos nucleicos adecuadas usando parejas de cebadores adecuadas (perfectas o degeneradas). El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico procedente de cualquier célula o tejido o ARNm o ADNc derivado de las células que expresan el anticuerpo NEO-300. Se conocen bien en la técnica los métodos para la expresión de secuencias heterólogas. Véase, *por ejemplo*, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

### **Proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo NEO-300**

Se pueden construir secuencias de codificación de proteínas híbridas que comprenden ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo NEO-300 descrito en el presente documento fusionado a secuencias de translocación. Estas secuencias de ácidos nucleicos pueden unirse operativamente a elementos control de la transcripción o la traducción, *por ejemplo*, secuencias de inicio de la transcripción y la traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de poliadenilación, y otras secuencias útiles para transcribir el ADN en ARN. En la construcción de cassetes de expresión recombinantes, vectores, y transgénicos, se puede emplear un fragmento de promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos deseados.

Las proteínas de fusión pueden comprender secuencias de translocación en el extremo C o el extremo N. Además, las proteínas de fusión pueden comprender elementos adicionales, *por ejemplo*, para la detección de proteínas, la purificación, u otras aplicaciones. Los dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, *por ejemplo*, péptidos quelantes de metales, tales como extensiones de polihistidina, módulos de triptófano-histidina, u otros dominios que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; proteínas de unión a maltosa; dominios de

proteína A que permiten la purificación sobre la inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en sistema de purificación por afinidad de la extensión FLAGS (Immunex Corp, Seattle WA.)

5 La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como el Factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, (1998) Biochimie 80: 289-93), el motivo de reconocimiento de la proteasa subtilisina (véase, por ejemplo, Polyak (1997) Protein Eng. 10: 615-19); la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA.), entre el dominio de traslocación (para la expresión eficaz de la membrana plasmática) el resto de polipéptidos traducidos recientemente puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, una construcción puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico unida a seis restos de histidina seguidos por una tiorredoxina, un sitio de escisión de la enteroquinasa  
10 (véase, por ejemplo, Williams (1995) Biochemistry 34: 1787-97), y un dominio de translocación en el extremo C. Los restos de histidina facilitan la detección y purificación mientras que el sitio de escisión de la enteroquinasa proporciona un medio para purificar la(s) proteína(s) deseada(s) procedentes del resto de la proteína de fusión. La tecnología que se refiere a los vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de las proteínas de fusión están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Kroll (1993) DNA Cell. Biol. 12: 441-53.  
15

### **Sistemas para la expresión recombinante del anticuerpo NEO-300**

20 Los vectores contienen elementos que facilitan la manipulación para la expresión de una proteína extraña en la célula hospedadora diana. De manera conveniente, la manipulación de secuencias y la producción de ADN para la transformación se lleva a cabo en primer lugar en un hospedador bacteriano (por ejemplo, *E. coli*) y usualmente los vectores incluirán secuencias para facilitar dichas manipulaciones, incluyendo un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano adecuado. Los marcadores de selección codifican las proteínas necesarias para la supervivencia o el crecimiento de las células hospedadoras transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, deficiencias auxotróficas del complemento, o suministro de nutrientes críticos no disponibles a partir de medios complejos. Se describen en la técnica los vectores y métodos ilustrativos para la transformación de levaduras. Véase, por ejemplo, Burke, et al. (2000) Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory Press.  
25  
30

La secuencia de codificación del polipéptido de interés puede unirse operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción que proporcionan la expresión del polipéptido en las células de levadura. Estos componentes de vectores pueden incluir, aunque no de forma limitativa, uno o más de los siguientes: un elemento potenciador, un promotor, y una secuencia de terminación de la transcripción. Las secuencias para la secreción del polipéptido pueden incluir también (por ejemplo, una secuencia de señalización).  
35

Los vectores de expresión, tanto como vectores de expresión individuales o como bibliotecas de vectores de expresión, que comprenden las secuencias de codificación de la región de unión al ligando que se pueden introducir en un genoma o en el citoplasma o un núcleo de una célula y expresarse mediante una variedad de técnicas convencionales, bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.  
40

Los ácidos nucleicos se pueden expresar en casetes de expresión, vectores o virus que se expresan de forma estable o transitoria en células (por ejemplo, sistemas de expresión episómicos). Se pueden incorporar marcadores de selección en casetes y vectores de expresión para conferir un fenotipo transformable en células y secuencias transformadas. Por ejemplo, los marcadores de selección pueden codificar en mantenimiento y la replicación episómicos de tal manera que no se requiere la integración en el genoma hospedador. Por ejemplo, el marcador puede codificar la resistencia a antibióticos (por ejemplo, cloranfenicol, kanamicina, G418, bleomicina, higromicina) o resistencia a los herbicidas (por ejemplo, clorosulfurona o Basta) para permitir la selección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas. Véase, por ejemplo, Ausubel, et al. (2011) [Ed.] Current Protocols in Molecular Biology John Wiley & Sons, Inc.; y Walker & Papley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5ª Ed.] Royal Society of Chemistry. debido a que los genes marcadores seleccionables confieren resistencia a sustratos similares a neomicina o higromicina, pueden solo utilizarse en el cultivo de tejidos, se usan también genes de quimiorresistencia como marcadores seleccionables *in vitro* e *in vivo*.  
45  
50  
55

Para permitir la expresión celular de los polinucleótidos de la presente invención, se puede usar una construcción de ácido nucleico de acuerdo con la presente invención, que incluye al menos una región de codificación de una de las anteriores secuencias de ácidos nucleicos, e incluye además al menos un elemento regulador que actúa en cis. Preferentemente, el promotor utilizado por la construcción de ácido nucleico de la presente invención es activo en la población de células específicas transformada. Los promotores son secuencias sin traducir localizadas en la dirección 5' (5') del codón de inicio de un gen estructural /generalmente, en aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y la traducción de las secuencias de ácidos nucleicos concretas a las cuales se unen operativamente. Dichos promotores se encuentran comprendidos en varias clases: promotores inducibles, constitutivos, y represibles (que aumentan, por ejemplo, los niveles de la transcripción en respuesta a la ausencia de un represor). Los promotores inducibles pueden iniciar niveles aumentados de la transcripción del ADN bajo su  
60  
65

control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo (por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura). Los ejemplos de tipos de células específico y/o promotores específicos de tejidos son bien conocidos en la técnica. Véase Bernardi (2003) [Ed.] Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells Volumen 38 Elsevier Science B.V. La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir además un potenciador, que puede ser adyacente o distante a la secuencia promotora y puede funcionar para regular por exceso la transcripción del anterior.

Un segundo vector de expresión puede producirse utilizando los mismos medios convencionales bien conocidos por las personas normalmente expertas en la técnica, dicho vector de expresión que contiene un operón y una secuencia de ADN que codifica una cadena ligera de anticuerpo donde la secuencia de ADN que codifica las CDR requeridas para la especificidad del anticuerpo se deriva de una fuente de células no humana, preferentemente, una fuente de linfocitos B de conejo, mientras que la secuencia de ADN que codifica las partes restantes de la cadena de anticuerpo se deriva de una fuente de células humana.

La construcción de ácido nucleico de la presente invención puede incluir además un marcador seleccionable adecuado y/o un origen de replicación. Preferentemente, la construcción de ácido nucleico utilizada es un vector lanzadera, que puede propagarse en *E. coli* (donde la construcción comprende un marcador seleccionable y un origen de replicación adecuados) y es compatible para la preparación en células, o la integración en un gen y un tejido de elección. La construcción de acuerdo con la presente invención puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

Los ejemplos de construcciones adecuadas incluyen, aunque no de forma limitativa, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto cada uno de los cuales está comercialmente disponible de Invitrogen Co. (Carlsbad, CA.) Los ejemplos de vector retrovírico y sistemas de empaquetamiento son aquellos comercializados por Clontech (San Diego, CA.), incluyendo los vectores Retro-X pLNCX y pLXSN, que permiten la clonación en múltiples sitios de clonación, y el transgén se transcribe desde el promotor de CMV. Se incluyen también los vectores derivados de Mo-MuLV tales como pBabe, donde el transgén se transcribirá desde el promotor 5' LTR.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula hospedadora, lo que significa que los vectores de expresión recombinantes incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas sobre la base de las células hospedadoras que se van a usar para la expresión, que está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. En un vector de expresión recombinante, se pretende que "unido operativamente" signifique que la secuencia de nucleótidos de interés está unida a la(s) secuencia reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (*por ejemplo*, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula hospedadora cuando el vector se introduce en la célula hospedadora).

Se pretende que la expresión "secuencia reguladora" incluya promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células hospedadoras y aquellos que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en determinadas células hospedadoras (*por ejemplo*, secuencias reguladoras específicas de tejidos). Los expertos en la materia apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de dichos factores tales como la elección de la célula hospedadora que se va a transformar, el nivel de expresión de la proteína deseada. Los vectores de expresión de la invención se pueden introducir en células hospedadoras para producir por tanto proteínas o péptidos, incluyendo las proteínas o péptidos de fusión, codificadas por los ácidos nucleicos que se describen en el presente documento.

Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la producción de variantes de proteínas en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención pueden expresarse en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insectos (*por ejemplo*, utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levaduras, o células de mamíferos. Las células hospedadoras adecuadas se describen además en Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Como alternativa, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, usando secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo más a menudo en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas tanto de fusión como de no fusión. Los vectores de fusión añaden numerosos aminoácidos a una proteína codificada del anterior, al extremo amino o C de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión sirven normalmente a tres fines: (i) para aumentar la expresión de la proteína recombinante; (ii) para aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) para ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de la fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante procedente del resto de

5 fusión posterior a la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento análogas, incluyen el factor Xa, trombina, PreScission, TEV y enteroquinasa. Los vectores de expresión de la fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que se fusiona a la glutatión S-transferasa (GST), la proteína E de unión a maltosa, o la proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

10 El vector de expresión de mamífero recombinante que es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico puede estar en un tipo de célula concreto (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejidos para expresar el ácido nucleico). se conocen en la técnica elementos reguladores específicos de tejidos. Para la producción eficaz de la proteína, es preferible colocar las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de la invención bajo el control de las secuencias control de la expresión optimizadas para la expresión en un hospedador deseado. Por ejemplo, las secuencias pueden incluir secuencias reguladoras de la transcripción y/o la traducción optimizadas (por ejemplo, secuencias Kozak alteradas).

15 Una estrategia para maximizar la expresión de la proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria hospedadora con una capacidad deteriorada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, CA. 185: 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia del ácido nucleico del ácido nucleico que se va a insertar en un vector de expresión de tal manera que los codones individuales de cada aminoácido son aquellos preferentemente utilizados en *E. coli*. Véase, por ejemplo, Wada, et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118. Dicha alteración de las secuencias de ácidos nucleicos de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN normalizadas. Otras estrategia para resolver el sesgo del codón es utilizar el codón BL21 más las cepas bacterianas (Invitrogen) o la cepa bacteriana Rosetta (Novagen), estas cepas contienen copias extra de genes de ARNt de *e. coli* raros.

25 El vector de expresión que codifica la proteína de la invención puede ser un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, et al. (1987) EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz (1982) Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz, et al. (1987) Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA.), y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA.)

30 Una célula hospedadora puede ser cualquier célula procarionta o eucariota. Por ejemplo, se puede producir la proteína de la invención en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levaduras, células vegetales o de mamíferos (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, células HEK293). Los expertos en la materia conocen otras células hospedadoras adecuadas.

35 Los polipéptidos de la presente invención pueden producirse en células de insecto utilizando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, et al. (1983) Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers (1989) Virology 170: 31-39). En otra realización más, un ácido nucleico se expresa en células de mamífero utilizando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed (1987) Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, et al. (1987) EMBO J. 6: 187-195), pIRESpuro (Clontech), pUB6 (Invitrogen), pCEP4 (Invitrogen) pREP4 (Invitrogen), pcDNA3 (Invitrogen). Cuando se usa en células de mamífero, los elementos reguladores víricos proporcionan a menudo proporcionan a menudo las funciones de control de la expresión del vector. Por ejemplo, los promotores usados comúnmente se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus, virus del sarcoma de Rous, y virus 40 de simio. Para otros sistemas de expresión adecuados para células procariontas y eucariotas véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory.

50 Los vectores de expresión se transfectan en una célula hospedadora mediante técnicas convencionales bien conocidas por las personas normalmente expertas en la materia para producir una célula hospedadora transfectada, dicha célula hospedadora transfectada se cultiva mediante técnicas convencionales bien conocidas por las personas normalmente expertas en la técnica para producir dichos polipéptidos de anticuerpos.

55 La célula hospedadora puede transfectarse simultáneamente con los dos vectores de expresión descritos anteriormente, el primer vector de expresión que contiene el ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena ligera y el segundo vector que contiene el ADN que codifica un operón y un polipéptido derivado de cadena pesada. Los dos vectores contienen diferentes marcadores seleccionables, pero preferentemente consiguen una expresión sustancialmente igual de los polipéptidos de cadena pesada y cadena ligera. Como alternativa, se puede usar un único vector, incluyendo el vector el ADN que codifica los polipéptidos de cadena pesada y cadena ligera. Las secuencias de codificación para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc, ADN genómico, o ambos.

60 Los métodos generales por los cuales pueden construirse los vectores, los métodos de transfección requeridos para producir la célula hospedadora y los métodos de cultivo requeridos para producir los anticuerpos, y los fragmentos de los mismos, procedentes de dichas células hospedadoras incluyen todos técnicas convencionales. Aunque preferentemente, la línea de células utilizada para producir el anticuerpo es una línea de células de mamífero, se

puede usar cualquier otra línea de células adecuada, tal como una línea de células bacterianas como una cepa bacteriana derivada de *E. coli*, o una línea de células de levadura.

5 Se puede introducir ADN de vector en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Como se usa en el presente documento, se pretende que los términos "transformación" y "transfección" se refieran a una variedad de técnicas reconocidas en la materia para introducir ácido nucleico extraño (*por ejemplo*, ADN) en una célula hospedadora, incluyendo precipitación simultánea con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección, o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o transfectar células hospedadoras pueden encontrarse en Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3ª Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory y otros manuales de laboratorio.

15 Se pueden usar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos extrañas en células hospedadoras. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores en plasma, vectores víricos y cualquiera de los métodos bien conocidos diferentes para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético extraño en una célula hospedadora. Véase, *por ejemplo*, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual [3ª Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory and Walker & Papley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5th Ed.] Royal Society of Chemistry. Es únicamente necesario que el procedimiento de ingeniería genética concreto utilizado sea capaz de introducir satisfactoriamente al menos una molécula de ácido nucleico en la célula hospedadora capaz de expresar el anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo.

25 Para la transfección estable de células de mamífero, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizados, solo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN extraño en su genoma. A fin de identificar y seleccionar estos integrantes, un gen que codifica un marcador seleccionable (*por ejemplo*, resistencia a antibióticos) se introduce generalmente en las células hospedadoras junto con el gen de interés. Los diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a los fármacos, tales como G418, higromicina, puromicina, blasticidina y metotrexato. Se pueden introducir ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable en una célula hospedadora en el mismo vector que la proteína codificante de la invención o se pueden introducir en un vector separado. Las células transfectadas de forma estable con el ácido nucleico introducido se pueden identificar mediante la selección de fármacos (*por ejemplo*, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

35 Una célula hospedadora de la invención, tal como una célula hospedadora procariota o eucariota en cultivo, se puede usar para producir (*es decir*, expresar) la proteína de la invención. Por consiguiente, la invención proporciona además métodos para producir proteínas de la invención utilizando las células hospedadoras de la invención. En una realización, El método comprende cultivar la célula hospedadora de la presente invención) donde se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica la proteína de la invención) en un medio adecuado de tal manera que se produzca la proteína de la invención. En otra realización, el método comprende además aislar la proteína de la invención del medio o la célula hospedadora.

40 después se introduce el vector de expresión en las células, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento o variante de interés, que se recupera a continuación del cultivo utilizando técnicas normalizadas. Los ejemplos de dichas técnicas son bien conocidos en la materia. Véase, *por ejemplo*, documento WO 00/06593. De manera similar, una vez producidos los anticuerpos, se pueden purificar de acuerdo con los procedimientos normalizados en la materia, tales como *por ejemplo*, la filtración en flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio, y cromatografía en columna de afinidad.

50 Por ejemplo, se pueden usar la producción de anticuerpos NEO-300 descrita en el presente documento, un vector que permite la inserción de los genes de la cadena pesada y la cadena ligera, con transfección a células CHO para optimizar la producción. El vector plásmido pRc/CMV que emplearon los inventores se diseñó con la intención de conseguir una alta expresión de los anticuerpos monoclonales quiméricos de los inventores. El vector tenía un sitio de clonación que aceptó los genes de la cadena pesada y la cadena ligera, insertándolos en la dirección 3' del CMV humano. El vector permite que se produzca el anticuerpo a niveles mayores que 1000 mg/l en un medio biorreactor, de tal manera que se pueden administrar dosis terapéuticas de 250-500 mg. Los vectores plásmidos pueden transportar una unidad de expresión *dhfr* impulsada por el promotor temprano del SV40 deficiente en potenciador. El vector puede insertarse en células CHO-D-SFM (células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa (*dhfr*)) en medio casi exento de suero suplementado con 1,0 µg/ml de metotrexato (MTX). Al final de la producción, las células pueden adaptarse a medio exento de suero antes de la purificación final del anticuerpo.

## 60 MARCAS

65 Los anticuerpos NEO-300 y los fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden modificarse de forma posterior a la traducción para añadir restos efectores tales como enlazadores químicos, restos detectables tales como *por ejemplo* colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, restos quimioluminiscentes, un agente citotóxico, materiales radioactivos, o restos funcionales.



Una amplia variedad de entidades, *por ejemplo*, ligandos, puede acoplarse a los oligonucleótidos, como se conoce en la técnica. Los ligandos pueden incluir moléculas de origen natural, o moléculas recombinantes o sintéticas. Los ligandos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, avadina, biotina, péptidos, peptidomiméticos, polilisina (PLL), polietilenglicol (PEG), mPEG, grupos catiónicos, espermina, espermidina, poliamina, tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensioactiva, mucina, poliaminoácidos glicosilados, transferrina, aptámero, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), insulina, transferrina, albúmina, azúcar, moléculas lipófilas (por ejemplo, esteroides, ácidos biliares, colesterol, ácido cólico, y ácidos grasos), vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, cofactores de vitaminas, lipopolisacáridos, hormonas y receptores de hormonas, lectinas, hidratos de carbono, hidratos de carbono multivalentes, marcadores radiomarcados, colorantes fluorescentes y derivad de los mismos. Véase, *por ejemplo*, patentes de Estados Unidos números 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; y 6.559.279.

Además, Se pueden añadir restos al anticuerpo NEO-300 para aumentar la semivida *in vivo* (*por ejemplo*, alargando el tiempo de aclaramiento en el torrente sanguíneo. Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, añadir restos PEG (denominado también pegilación), y son bien conocidos en la técnica. Véase la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2003/0031671.

Un anticuerpo NEO-300 o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden "unirse" a un sustrato cuando se asocia con la marca sólida a través de una interacción química o física no aleatoria. la unión puede ser a través de un enlace covalente. Sin embargo, las uniones no necesitan ser covalentes o permanentes. Los materiales pueden unirse a una marca a través de una "molécula separadora" o un "grupo enlazador". Dichas moléculas separadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une a la marca. Por lo tanto, cuando se une a la marca, la molécula separadora separa la marca y los materiales biológicos, pero se une a ambos. Los métodos para unir el material biológico material (*por ejemplo*, la marca) a una marca son bien conocidos en la materia e incluyen, aunque no de forma limitativa el acoplamiento químico.

#### **Marcas detectables**

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden modificarse de forma posterior a la traducción para añadir marcas efectoras tales como enlazadores químicos, marcas detectables tales como por ejemplo colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, y marcas quimioluminiscentes, o marcas funcionales tales como por ejemplo estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico, y materiales radioactivos. Las enzimas ilustrativas adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, peroxidasa de rábano picante, acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina,  $\alpha$ -galactosidasa y luciferasa. Los materiales fluorescentes ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, rodamina, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, umbeliferona, diclorotriazinilamina, ficoeritrina y cloruro de dansilo. Las marcas quimioluminiscentes ilustrativas adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, luminol. Los materiales bioluminiscentes ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, luciferina y aequorina. Los materiales radioactivos ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, bismuto-213 ( $^{213}\text{Bs}$ ), carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ), carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), cloro-18 ( $^{18}\text{Cl}$ ), cromo-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), cobalto-57 ( $^{57}\text{Co}$ ), cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), disprosio-165 ( $^{165}\text{Dy}$ ), erbio-169 ( $^{169}\text{Er}$ ), flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), germanio-68 ( $^{68}\text{Ge}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), yodo-123 ( $^{123}\text{I}$ ), yodo-124 ( $^{124}\text{I}$ ), yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), iridio-192 ( $^{192}\text{Ir}$ ), hierro-59 ( $^{59}\text{Fe}$ ), criptón-81 ( $^{81}\text{Kr}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), molibdeno-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), nitrógeno-13 ( $^{13}\text{N}$ ), oxígeno-15 ( $^{15}\text{O}$ ), paladio-103 ( $^{103}\text{Pd}$ ), fósforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), potasio-42 ( $^{42}\text{K}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-81 ( $^{81}\text{Rb}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), selenio-75 ( $^{75}\text{Se}$ ), sodio-24 ( $^{24}\text{Na}$ ), estroncio-82 ( $^{82}\text{Sr}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), azufre 35 ( $^{35}\text{S}$ ), tecnecio-99m ( $^{99}\text{Tc}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), xenon-133 ( $^{133}\text{Xe}$ ), iterbio-169 ( $^{169}\text{Yb}$ ), iterbio-177 ( $^{177}\text{Yb}$ ), e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

#### **Agentes citotóxicos**

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden conjugarse con agentes citotóxicos que incluyen, aunque no de forma limitativa, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina; agentes alquilantes tales como mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU), 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfán, dibromomanitol, estreptoizotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino y carboplatino (paraplatino); las antraciclina incluyen daunorrubicina (antiguamente daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; los antibióticos incluyen dactinomomicina (actinomomicina D), bleomicina, caliqueamicina, mitramicina, y antramicina (AMC); y agentes antimetabólicos tales como alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos incluyen paclitaxel (TAXOL®), ricina, exotoxina de pseudomonas, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticoesteroides, mitotano (O, $P^2$ -(DDD)), interferones, y mezclas de estos agentes citotóxicos.

Los agentes citotóxicos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes quimioterapéuticos tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliqueamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamida, vincristina, bleomicina, antagonistas de VEGF, antagonistas de EGFR, platinos, taxoles, irinotecán, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, esteroides, ciclofosfamida, melfalán, alcaloides de la vinca (*por ejemplo*, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), mustinas, inhibidores de la tirosina quinasa, radioterapia, antagonistas de las hormonas sexuales, moduladores selectivos de los receptores de andrógenos, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, antagonistas de PDGF, antagonistas de TNF, antagonistas de IL-1, interleuquinas (*por ejemplo*, IL-12 o IL-2), antagonistas de IL-12R, anticuerpos monoclonales conjugados con toxinas, anticuerpos monoclonales específicos de antígenos tumorales, Erbitux®, Avastin®, Pertuzumab, anticuerpos dirigidos contra CD20, Rituxan®, ocrelizumab, ofatumumab, DXL625, Herceptin®, o cualquier combinación de la misma. Enzimas tóxicas de plantas y bacterias tales como ricina, la toxina de la difteria y la toxina de *Pseudomonas* pueden conjugarse con los anticuerpos humanizados o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, para generar reactivos destructores específicos del tipo de células. Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5483; Gilliland, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 4539; Krolick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5419. Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas citotóxicas. véase la patente de Estados Unidos n.º. 6.653.104.

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden conjugarse a un radionucleido que emite partículas alfa o beta (*por ejemplo*, radioinmunoconjugados). Dichos isótopos radioactivos incluyen, aunque no de forma limitativa, emisores beta tales como fósforo-32 (<sup>32</sup>P), escandio-47 (<sup>47</sup>Sc), cobre-67 (<sup>67</sup>Cu), galio-67 (<sup>67</sup>Ga), itrio-88 (<sup>88</sup>Y), itrio-90 (<sup>90</sup>Y), yodo-125 (<sup>125</sup>I), yodo-131 (<sup>131</sup>I), samario-153 (<sup>153</sup>Sm), lutecio-177 (<sup>177</sup>Lu), renio-186 (<sup>186</sup>Re), renio-188 (<sup>188</sup>Re), y emisores alfa tales como astatina-211 (<sup>211</sup>At), plomo-212 (<sup>212</sup>Pb), bismuto-212 (<sup>212</sup>Bi), bismuto-213 (<sup>213</sup>Bi) o actinio-225 (<sup>225</sup>Ac).

se conocen en la técnica métodos para conjugar un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento para una marca, tales como los métodos descritos por Hunter, et al (1962) Nature 144: 945; David, et al. (1974) Biochemistry 13: 1014; Pain, et al. (1981) J. Immunol. Meth. 40: 219; y Nygren (1982) Histochem, and Cytochem, 30: 407.

### 30 AGENTES SECUNDARIOS PARA ADMINISTRACIÓN O PREMEZCLA

Los anticuerpos NEO-300 y los fragmentos de los mismos descritos en el presente documento pueden administrarse junto con, de forma simultánea o secuencial, o premezclarse con restos que incluyen, aunque no de forma limitativa, anticuerpos, colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, restos quimioluminiscentes, un agente citotóxico, materiales radioactivos, o restos funcionales.

Los ejemplos de anticuerpos que se pueden premezclar o administrar junto con un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) incluyen, aunque no de forma limitativa, NPC-1 (NEO-100), 16C3 (NEO-200), y/o anticuerpos 31.1 (NEO-300). Los anticuerpos NPC-1 (NEO-100) se unen selectivamente a un epítipo NPC-1 en MUC5AC (SEQ ID NOS: 1-4). Los anticuerpos 16C3 (NEO-200) se unen selectivamente a un epítipo 16C3 en CEACAM5/6 (SEQ ID NOS: 5-9). los anticuerpos 31.1 (NEO-300), como se describe en el presente documento, se unen selectivamente al epítipo 31.1 en el antígeno A33 (SEQ ID NOS: 10-13). Véase *también* documento WO 2011/163401.

Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se pueden premezclar o administrarse junto con un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) incluyen, aunque no de forma limitativa, un anticuerpo NPC-1 que se une selectivamente al antígeno de NPC-1 (*por ejemplo*, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO: 14, 15 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:16, 17, 18 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:19, 20 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:21, 22, 23, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:24, 25 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:26, 27, 28 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:29, 30 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:31, 32, 33, y las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:34, 35 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:36, 37); un anticuerpo 16C3 que se une selectivamente al antígeno 16C3 (*por ejemplo*, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:38, 39 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:40, 41, 42 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:44, 45 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:45, 46, 47, las cadenas ligeras ilustrativas adicionales se representan gráficamente en las SEQ ID NO:48, 49, 50, 51, 52 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:53, 54, 55, 56, 57, y las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:58, 59 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:60, 61, 62 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:63, 64 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NO:65, 66, 67) y el anticuerpo para el antígeno A33 que se une selectivamente al antígeno A33 (*por ejemplo*, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en la SEQ ID NO:68 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en la SEQ ID NO:69 y las cadenas ligeras ilustrativas adicionales se representan gráficamente en la SEQ ID NO:71 y las cadenas pesadas se representa gráficamente en la SEQ ID NO:73). Véase *también* documento WO 2011/163401. El anticuerpo monoclonal 31.1, descrito en los documentos

WO 02/074251 y WO 2006/004950, presenta especificidad por el antígeno A33.

Los ejemplos de anticuerpos humanizados que se pueden premezclar o administrarse junto con un anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303 incluyen, aunque no de forma limitativa a NEO-103 que se une selectivamente al antígeno NPC-1 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO: 34 -35 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO: 36 -37), 16C3) (h16C3) que se une selectivamente al antígeno de 16C3 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 38-52 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 53-57); NEO-201 (h16C3-Abb\*) que se une selectivamente al antígeno de 16C3 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en SEQ ID NO:59 con las CDR que se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 60-62, las cadenas pesadas se representan gráficamente en la SEQ ID NO:64 con las CDR que se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 65-67); y NEO-302 que se une selectivamente al antígeno A33 (*por ejemplo*, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:70-71 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NO:72-73). Véase también documento WO 2011/163401.

Los ejemplos de anticuerpos quiméricos que se pueden premezclar o administrarse junto con un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) incluyen, aunque no de forma limitativa NEO-101 (NPC-1C) que se une selectivamente al antígeno de NPC-1 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 14, 15 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NOS: 16-18 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 19, 20 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NOS: 21-23); NEO-102 que se une selectivamente al antígeno de NPC-1 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 24, 25 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NOS: 26-28 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en las SEQ ID NOS: 29, 30 con las CDR representadas gráficamente en las SEQ ID NOS: 31-33); y NEO-301 (31.1C) que se une selectivamente al antígeno A33 (por ejemplo, las cadenas ligeras ilustrativas se representan gráficamente en la SEQ ID NO:68 y las cadenas pesadas se representan gráficamente en la SEQ ID NO:69). Véase también documento WO 2011/163401.

el anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) puede premezclarse o administrarse junto con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos para los anticuerpos que se unen al antígeno de NPC-1 que se proporcionan en las SEQ ID NOS: 14, 19, 24, 29, 34, y 36 (que codifican los polipéptidos de las SEQ ID NOS:15, 20, 25, 30, 35, y 37, respectivamente) incluyendo las cadenas ligeras de los anticuerpos (SEQ ID NO: 14, 24, and 34), las cadenas pesadas de los anticuerpos (SEQ ID NO: 15, 25, y 35). Además, los polipéptidos del anticuerpo NPC-1 ilustrativo incluyen la cadena ligera humanizada (SEQ ID NO:71) y la cadena pesada humanizada (SEQ ID NO:36).

el anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) puede premezclarse o administrarse junto con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos para los anticuerpos que se unen al antígeno de 16C3 que se proporcionan en las SEQ ID NOS: 38, 43, 58, y 100 (que codifican los polipéptidos de SEQ ID NO:39, 44, 59, y 101, respectivamente) incluyendo las cadenas ligeras del anticuerpos (SEQ ID NOS: 38 and 58), las cadenas pesadas del anticuerpo (SEQ ID NOS: 43 y 63).

el anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) puede premezclarse o administrarse junto con los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos para los anticuerpos que se unen al antígeno A33 que se proporcionan en las SEQ ID NOS: 70 y 72 (que codifican los polipéptidos de SEQ ID NO:71 y 73, respectivamente) incluyendo las cadenas ligeras del anticuerpo (SEQ ID NO:70), las cadenas pesadas del anticuerpo (SEQ ID NO:72).

Los ligandos que pueden administrarse junto o premezclarse con los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos pueden incluir moléculas de origen natural, o moléculas recombinantes o sintéticas. Los ligandos ilustrativos incluyen, aunque no de forma limitativa, avadina, biotina, péptidos, peptidomiméticos, polilisina (PLL), polietilenglicol (PEG), mPEG, grupos catiónicos, espermina, espermidina, poliamina, tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína A tensoactiva, mucina, poliaminoácidos glicosilados, transferrina, aptámero, inmunoglobulinas (*por ejemplo*, anticuerpos), insulina, transferrina, albúmina, azúcar, moléculas lipófilas (*por ejemplo*, esteroides, ácidos biliares, colesterol, ácido cólico, y ácidos grasos), vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, cofactores de vitaminas, lipopolisacáridos, hormonas y receptores de hormonas, lectinas, hidratos de carbono, hidratos de carbono multivalentes, marcadores radiomarcados, colorantes fluorescentes y derivado de los mismos. Véase, *por ejemplo*, patentes de Estados Unidos números 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031; 6.528.631; y 6.559.279.

#### **Marcas detectables**

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden administrarse con, de forma tanto simultánea como secuencial, o premezclarse con marcas tales como enlazadores químicos, marcas detectables tales como por ejemplo colorantes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radioactivos, y marcas quimioluminiscentes, o marcas funcionales tales como por ejemplo estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico, y materiales radioactivos. Las enzimas ilustrativas adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, peroxidasa de rábano picante,

acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina,  $\alpha$ -galactosidasa y luciferasa. Los materiales fluorescentes ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, rodamina, fluoresceína, isocianato de fluoresceína, umbeliferona, diclorotriazinilamina, ficoeritrina y cloruro de dansilo. Las marcas quimioluminiscentes ilustrativas adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, luminol. Los materiales bioluminiscentes ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, luciferina y aeuorina. Los materiales radioactivos ilustrativos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, bismuto-213 ( $^{213}\text{Bs}$ ), carbono-14 ( $^{14}\text{C}$ ), carbono-11 ( $^{11}\text{C}$ ), cloro-18 ( $^{18}\text{Cl}$ ), cromo-51 ( $^{51}\text{Cr}$ ), cobalto-57 ( $^{57}\text{Co}$ ), cobalto-60 ( $^{60}\text{Co}$ ), cobre-64 ( $^{64}\text{Cu}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), disprosio-165 ( $^{165}\text{Dy}$ ), erbio-169 ( $^{169}\text{Er}$ ), flúor-18 ( $^{18}\text{F}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), galio-68 ( $^{68}\text{Ga}$ ), germanio-68 ( $^{68}\text{Ge}$ ), holmio-166 ( $^{166}\text{Ho}$ ), indio-111 ( $^{111}\text{In}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), yodo-123 ( $^{124}\text{I}$ ), yodo-124 ( $^{124}\text{I}$ ), yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), iridio-192 ( $^{192}\text{Ir}$ ), hierro-59 ( $^{59}\text{Fe}$ ), criptón-81 ( $^{81}\text{Kr}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), molibdeno-99 ( $^{99}\text{Mo}$ ), nitrógeno-13 ( $^{13}\text{N}$ ), oxígeno-15 ( $^{15}\text{O}$ ), paladio-103 ( $^{103}\text{Pd}$ ), fósforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), potasio-42 ( $^{42}\text{K}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), rubidio-81 ( $^{81}\text{Rb}$ ), rubidio-82 ( $^{82}\text{Rb}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), selenio-75 ( $^{75}\text{Se}$ ), sodio-24 ( $^{24}\text{Na}$ ), estroncio-82 ( $^{82}\text{Sr}$ ), estroncio-89 ( $^{89}\text{Sr}$ ), azufre 35 ( $^{35}\text{S}$ ), tecnecio-99m ( $^{99}\text{Tc}$ ), talio-201 ( $^{201}\text{Tl}$ ), tritio ( $^3\text{H}$ ), xenon-133 ( $^{133}\text{Xe}$ ), iterbio-169 ( $^{169}\text{Yb}$ ), iterbio-177 ( $^{177}\text{Yb}$ ), e itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ).

### Agentes citotóxicos

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden administrarse con, de forma tanto simultánea como secuencial, o premezclarse con agentes citotóxicos incluyendo, aunque no de forma limitativa, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil dacarbazina; agentes alquilantes tales como mecloretamina, tiotepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU), 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino y carboplatino (paraplatino); las antraciclinas incluyen daunorrubicina (antiguamente daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; los antibióticos incluyen dactinomicina (actinomicina D), bleomicina, caliqueamicina, mitramicina, y antramycin (AMC); y agentes antimetabólicos tales como alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos incluyen paclitaxel (TAXOL®), ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxiantracindiona, 1-deshidrottestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, procarbazona, hidroxiaurea, asparaginasa, corticoesteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones, y mezclas de estos agentes citotóxicos.

Los agentes citotóxicos adicionales incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes quimioterapéuticos tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliqueamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamida, vincristina, bleomicina, antagonistas de VEGF, antagonistas de EGFR, platinos, taxoles, irinotecán, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, esteroides, ciclofosfamida, melfalán, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), mustinas, inhibidores de la tirosina quinasa, radioterapia, antagonistas de las hormonas sexuales, moduladores selectivos de los receptores de andrógenos, moduladores selectivos de los receptores de estrógenos, antagonistas de PDGF, antagonistas de TNF, antagonistas de IL-1, interleuquinas (*por ejemplo*, IL-12 o IL-2), antagonistas de IL-12R, anticuerpos monoclonales conjugados con toxinas, anticuerpos monoclonales específicos de antígenos tumorales, Erbitux®, Avastin®, Pertuzumab, anticuerpos dirigidos contra CD20, Rituxan®, ocrelizumab, ofatumumab, DXL625, Herceptin®, o cualquier combinación de la misma. Enzimas tóxicas de plantas y bacterias tales como ricina, la toxina de la difteria y la toxina de *Pseudomonas* pueden conjugarse con los anticuerpos humanizados o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, para generar reactivos destructores específicos del tipo de células. Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5483; Gilliland, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 4539; Krolick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 77: 5419. Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas citotóxicas. véase la patente de Estados Unidos n.º. 6.653.104.

Un anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden administrarse con, tanto de forma simultánea como secuencial, o premezclarse con un radionucleido que emite partículas alfa o beta (por ejemplo, radioinmunoconjugados). Dichos isótopos radioactivos incluyen, aunque no de forma limitativa, emisores beta tales como fósforo-32 ( $^{32}\text{P}$ ), escandio-47 ( $^{47}\text{Sc}$ ), cobre-67 ( $^{67}\text{Cu}$ ), galio-67 ( $^{67}\text{Ga}$ ), itrio-88 ( $^{88}\text{Y}$ ), itrio-90 ( $^{90}\text{Y}$ ), yodo-125 ( $^{125}\text{I}$ ), yodo-131 ( $^{131}\text{I}$ ), samario-153 ( $^{153}\text{Sm}$ ), lutecio-177 ( $^{177}\text{Lu}$ ), renio-186 ( $^{186}\text{Re}$ ), renio-188 ( $^{188}\text{Re}$ ), y emisores alfa tales como astatina-211 ( $^{211}\text{At}$ ), plomo-212 ( $^{212}\text{Pb}$ ), bismuto-212 ( $^{212}\text{Bi}$ ), bismuto-213 ( $^{213}\text{Bi}$ ) o actinio-225 ( $^{225}\text{Ac}$ ).

### SUSTRATOS

El anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303), descritos en el presente documento pueden unirse a un sustrato. Numerosos sustratos (por ejemplo, soportes sólidos) conocidos en la técnica son adecuados para el uso con el anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión al mismo, descritos en el presente documento. El sustrato puede modificarse para contener canales u otras configuraciones. Véase Fung (2004) [Ed.] Protein Arrays: Methods and Protocols Humana Press y Kambhampati (2004) [Ed.] Protein Microarray Technology John Wiley & Sons.

Los materiales de sustratos incluyen, aunque no de forma limitativa acrílicos, agarosa, vidrio de borosilicato, carbono (*por ejemplo*, láminas o aglomerados de nanofibras de carbono), acetato de celulosa, celulosa, materiales cerámicos, geles, vidrio (*por ejemplo*, materiales inorgánicos, de poro controlado, modificados, cal sodada, o vidrio funcionalizado), látex, perlas magnéticas, membranas, metales, metaloides, nitrocelulosa, NYLON®, haces de fibras ópticas, polímeros orgánicos, papel, plásticos, poliacriloilmorfolida, poli(4-metilbuteno), poli(tereftalato de etileno), poli(butirato de vinilo), poliacrilamida, polibutileno, policarbonato, polietileno, tereftalato de polietilenglicol, poliformaldehído, polimetacrilato, polimetilmetacrilato, polipropileno, polisacáridos, poliestireno, poliuretanos, polivinilacetato, policloruro de vinilo, difluoruro de polivinilideno) (PVDF), polivinilpirrolidina, rayón, resinas, cauchos, materiales semiconductores, SEPHAROSE®, sílice, silicio, copolímeros de estireno, TEFLON®, y una variedad de diferentes polímeros.

Los sustratos no necesitan ser planos y pueden incluir cualquier tipo de forma, incluyendo formas esféricas (*por ejemplo*, perlas) o formas cilíndricas (*por ejemplo*, fibras). Los materiales unidos a soportes sólidos puede unirse a cualquier parte del soporte sólido (*por ejemplo*, pueden unirse a una parte interior de un material de soporte sólido poroso).

El cuerpo del sustrato puede estar en forma de una perla, caja, columna, cilindro, disco, placa (*por ejemplo*, placa de vidrio, placa PETRI), fibra, película, filtro, placa de microvaloración (*por ejemplo*, placa de microvaloración de 96 pocillos), varilla multihojas, malla, aglomerado, placa, anillo, varilla, cilindro, lámina, porta, barra, bandeja, tubo, o vial. El sustrato puede ser un cuerpo individual singular (*por ejemplo*, un tubo individual, una perla individual), cualquier número de una pluralidad de cuerpos de sustrato (*por ejemplo*, una gradilla de 10 tubos, algunas perlas), o combinaciones de las mismas (*por ejemplo*, una bandeja comprende una pluralidad de placas de microvaloración, una columna rellena con perlas, una placa de microvaloración rellena con perlas).

Un anticuerpo NEO-300 o fragmento de anticuerpo del mismo (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303), descritos en el presente documento pueden "unirse" a un sustrato cuando se asocia con el sustrato sólido a través de una interacción química o física no aleatoria. La unión puede ser a través de un enlace covalente. Sin embargo, las uniones no necesitan ser covalentes o permanentes. Los materiales pueden unirse a un sustrato a través de una "molécula separadora" o un "grupo enlazador". Dichas moléculas separadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une al sustrato. Por lo tanto, cuando se une al sustrato, la molécula separadora separa el sustrato y los materiales biológicos, pero se une a ambos. Los métodos para unir el material biológico (*por ejemplo*, la marca) a un sustrato son bien conocidos en la materia e incluyen, aunque no de forma limitativa el acoplamiento químico.

Se pueden usar placas, tales como placas de microvaloración, que soportan y contienen la fase sólida para las reacciones sintéticas de la fase sólida. Las placas de microvaloración pueden alojar perlas que se usan como la fase sólida. Por "partícula" o "micropartícula" o "nanopartícula" o "perla" o "microperla" o "microesfera" en el presente documento se entiende materia microparticulada que tiene cualquiera de una variedad de formas o tamaños. La forma puede ser generalmente esférica, pero no es necesariamente esférica, siendo, *por ejemplo*, cilíndrica o poliédrica. Como apreciarán los expertos en la materia, las partículas pueden comprender una amplia variedad de materiales dependiendo de su uso, incluyendo, aunque no de forma limitativa, almidón reticulado, dextranos, celulosa, proteínas, polímeros orgánicos, incluyendo polímeros de estireno tales como poliestireno y metilmetacrilato así como otros copolímeros de estireno, plásticos, vidrio, materiales cerámicos, polímeros acrílicos, materiales magnéticamente sensibles, coloides, toriasol, grafito de carbono, dióxido de titanio, nylon, látex, y TEFLON®. Véanse *por ejemplo*, "Microsphere Detection Guide" from Bangs Laboratories, Fishers, IN.

Un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de anticuerpo del mismo descrito en el presente documento puede unirse a o en cualquiera de las formas de sustratos descritas en el presente documento (*por ejemplo*, una perla, caja, columna, cilindro, disco, placa (*por ejemplo*, placa de vidrio, placa PETRI), fibra, película, filtro, placa de microvaloración (*por ejemplo*, placa de microvaloración de 96 pocillos), varilla multihojas, malla, aglomerado, placa, anillo, varilla, cilindro, lámina, porta, barra, bandeja, tubo, o vial). En particular, las partículas o perlas pueden ser un componente de un material de gelificación o pueden ser componentes separados tales como perlas de látex preparadas de una variedad de plásticos sintéticos (*por ejemplo*, poliestireno). La marca (*por ejemplo*, estreptavidina) puede unirse a un sustrato (*por ejemplo*, una perla).

## COMPOSICIONES FARMACÉUTICAS

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para la administración a un mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para la administración *mediante* una o más de numerosas rutas, incluyendo, aunque no de forma limitativa, bucal, epicutánea, epidural, inhalación, intraarterial, intracardial, intracerebroventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal, mediante un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica, y transmucosal. Asimismo, la administración puede producirse por medio de inyección, polvo, líquido, gel, gotas, u otros medios de administración.

Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un transportador, usualmente un

líquido, donde se formula un agente terapéutico activo. En una realización de la invención, el agente terapéutico activo es un anticuerpo humanizado descrito en el presente documento, o uno o más fragmentos del mismo. El excipiente generalmente no proporciona ninguna actividad farmacológica a la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y/o biológica, y características de liberación. Se pueden encontrar formulaciones ilustrativas, por ejemplo, en Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21ª Ed.]

Las composiciones farmacéuticas normalmente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La invención contempla que la composición farmacéutica esté presente en forma liofilizada. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para una concentración alta de fármaco. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, puede usarse agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido), y las mezclas adecuadas de los mismos. La invención contempla además la inclusión de un estabilizante en la composición farmacéutica.

Los anticuerpos NEO-300 y los fragmentos de los mismos (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) de la presente invención pueden formularse en composiciones farmacéuticas de diversas formas farmacéuticas. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, al menos un antígeno A33, un anticuerpo dirigido contra NPC-1, un anticuerpo dirigido contra 16C3, u otro anticuerpo NEO-300 o fragmentos de unión a antígeno del mismo, como el principio activo puede mezclarse con transportadores y aditivos adecuados de acuerdo con las técnicas bien conocidas por los expertos en la materia de las formulaciones farmacéuticas. Véase Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21ª Ed.] Por ejemplo, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden formularse en solución salina tamponada con fosfato a pH 7,2 y suministrarse como 5,0 mg/ml de una solución líquida incolora transparente.

De manera similar, las composiciones para las preparaciones líquidas incluyen soluciones, emulsiones, dispersiones, suspensiones, jarabes, y elixires, con transportadores y aditivos adecuados incluyendo, aunque no de forma limitativa, agua, alcoholes, aceites, glicoles, conservantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes, y agentes de suspensión. Las preparaciones típicas para la administración parenteral comprenden el principio activo con un transportador tal como agua estéril o un aceite parenteralmente aceptable que incluye, aunque no de forma limitativa, polietilenglicol, polivinilpirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete y aceite de sésamo, pueden estar incluidos otros aditivos para ayudar a la solubilidad o a la preservación. En el caso de una solución, esta puede liofilizarse hasta un polvo y a continuación reconstituirse inmediatamente antes del uso. Para las dispersiones y suspensiones, los transportadores y aditivos adecuados incluyen gomas acuosas, celulosas, silicatos, o aceites.

Para cada una de las realizaciones enumeradas, el anticuerpo NEO-300 o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, descritos en el presente documento pueden administrarse mediante una variedad de formas farmacéuticas. se contemplan cualquier forma farmacéutica biológicamente aceptable conocida por las personas normalmente expertas en la técnica, y las combinaciones de las mismas. Los ejemplos de dichas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, inhaladores, inhaladores en aerosol, parches, inhaladores de partículas, implantes, implantes de depósito, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramusculares, intravenosos, e intradérmicos), infusiones, y combinaciones de los mismos.

En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, *por ejemplo*, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede facilitarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, *por ejemplo*, sales de monoestearato y gelatina. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en una formulación de liberación temporal, *por ejemplo*, en una composición que incluya un polímero de liberación lenta. El anticuerpo NEO-300 o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, pueden prepararse con transportadores que protegerán al compuesto contra la liberación rápida, tales como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles, biodegradables, tales como acetato de etileno vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y copolímeros polilácticos, poliglicólicos (PLG). Los expertos en la materia conocen muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones.

Una persona experta en la materia sería capaz de determinar una dosificación y frecuencia de administración eficaces mediante experimentación rutinaria, guiada, por ejemplo, por la divulgación en el presente documento y las enseñanzas en Goodman, et al. (2011) Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics [12ª Ed.]; Howland, et al. (2005) Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology [2ª Ed.]; y Golan, (2008) Principles of Pharmacology: The Pathophysiologic Basis of Drug Therapy [2ª Ed.] Véase, *también*, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21ª Ed.]

#### Rutas de administración

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en cualquiera de las siguientes rutas: bucal, epicutánea, epidural, infusión, inhalación, intraarterial, intracardial, intracerebroventricular, intradérmica,

intramusculares, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, pulmonar, rectal, mediante un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica, y transmucosal. Las rutas de administración preferidas son la inyección o infusión intravenosa. La administración puede ser local, cuando la composición se administra directamente, cercana a, en la proximidad, próxima, a, aproximadamente, o cerca de, el(los) sitio(s) de la enfermedad, *por ejemplo*, un tumor, o de forma sistémica, donde la composición se administra al paciente y pasa a través del cuerpo ampliamente, alcanzando por tanto el(los) sitio(s) de la enfermedad. La administración local (por ejemplo, una inyección) puede llevarse a cabo mediante la administración a la célula, tejido, órgano, y/o sistema orgánico, que abarca y/o se ve afectado por la enfermedad, y/o donde los signos y/o los síntomas de la enfermedad son activos o es probable que se produzcan (por ejemplo, el sitio del tumor). La administración puede ser tópica con un efecto local, la composición se aplica directamente donde se desea su acción (por ejemplo, el sitio del tumor).

Para cada una de las realizaciones enumeradas, los compuestos se pueden administrar mediante una variedad de formas farmacéuticas, como se conoce en la técnica. Se contemplan cualesquiera formas farmacéuticas biológicamente aceptables conocidas por personas normalmente expertas en la materia, y las combinaciones de las mismas. Los ejemplos de dichas formas farmacéuticas incluyen, sin limitación, comprimidos masticables, comprimidos de disolución rápida, comprimidos efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos multicapa, comprimidos bicapa, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas, pastillas para chupar, pastillas masticables, perlas, polvos, encías, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, irrigadores vaginales, supositorios, cremas, composiciones tópicas, inhaladores, inhaladores en aerosol, parches, inhaladores de partículas, implantes, implantes de depósito, composiciones ingeribles, inyectables (incluyendo subcutáneos, intramusculares, intravenosos, e intradérmicos), infusiones, y combinaciones de los mismos.

otros compuestos que se pueden incluir mediante premezcla son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes (por ejemplo, diluyentes sólidos y líquidos), tales como lactosa, dextrosa sacarosa, celulosa, almidón o fosfato de calcio para comprimidos o cápsulas, aceite de oliva u oleato de etilo para cápsulas blandas y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes tales como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes gelificantes tales como arcillas coloidales; agentes espesantes tales como goma tragacanto o alginato de sodio, agentes de unión tales como almidones, gomas arábigas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes tales como almidón, ácido algínico, alginatos o almidón glicolato de sodio; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes hidratantes tales como lecitina, polisorbatos o laurilsulfatos; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables, tales como humectantes, conservantes, tampones y antioxidantes, que son aditivos conocidos para dichas formulaciones.

Las dispersiones líquidas para la administración oral pueden ser jarabes, emulsiones, soluciones, o suspensiones. Los jarabes pueden contener como transportador, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener un transportador, por ejemplo, una goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, o alcohol polivinílico.

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona kits que incluyen uno o más recipientes que comprenden formas farmacéuticas unitarias que comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención. Los kits pueden incluir instrucciones, direcciones, marcas, información comercial, advertencias, o folletos informativos.

#### 45 *Dosificaciones*

La cantidad de anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303), en una composición terapéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la presente invención, puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, género, peso, antecedentes del paciente, factores de riesgo, predisposición a enfermedades, ruta de administración, régimen de tratamiento preexistente (por ejemplo, interacciones posibles con otras medicaciones), y peso del individuo. Pueden ajustarse los regímenes de dosificación para proporcionar la respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar en el tiempo varias dosis divididas, o la dosis se puede reducir proporcionalmente o aumentarse tal como indiquen las exigencias de situación terapéutica.

Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Las formas farmacéuticas unitarias que se utilizan en el presente documento se refieren a unidades físicamente independientes adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de anticuerpos, y fragmentos de los mismos, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico requerido. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la invención viene dictaminada por y depende directamente de las características únicas de los anticuerpos, y los fragmentos de los mismos, y el efecto terapéutico particular a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica para componer dichos anticuerpos, y fragmentos de los mismos, para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. en el uso terapéutico para el tratamiento de dolencias en mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para el cual son eficaces los

anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención o una composición farmacéutica adecuada de los mismos, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención pueden administrarse en una cantidad eficaz. Las dosificaciones que son adecuadas para la presente invención pueden ser una composición, una composición farmacéutica o cualesquiera otras composiciones descritas en el presente documento.

5 La dosificación puede administrarse como una única dosis, una dosis doble, una dosis triple, una dosis cuádruple, y/o una dosis quádruple. Las dosificaciones pueden administrarse de forma singular, simultánea, y secuencial.

10 La forma farmacéutica puede ser cualquier forma de liberación conocida por las personas normalmente expertas en la técnica. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para proporcionar una liberación inmediata del principio activo o una liberación sostenida o controlada del principio activo. en una preparación de liberación sostenida o liberación controlada, la liberación del principio activo puede producirse a una velocidad tal que los niveles en sangre se mantienen en un intervalo terapéutico, pero por debajo de los niveles tóxicos durante un periodo de tiempo extendido (*por ejemplo*, 4 a 24 horas). Las formas farmacéuticas preferidas incluyen la liberación inmediata, liberación extendida, liberación pulsada, liberación variable, liberación controlada, liberación temporalizada, liberación sostenida, liberación retrasada, acción prolongada, y las combinaciones de las mismas, y son conocidas en la técnica.

20 se apreciará que la actividad farmacológica de las composiciones puede vigilarse utilizando modelos farmacológicos normalizados que son conocidos en la técnica. Además, se apreciará que las composiciones que comprenden un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, pueden incorporarse o encapsularse en una matriz o membrana polimérica adecuada para la administración específica de sitio, o pueden funcionalizarse con agentes de direccionamiento específicos capaces de efectuar la administración específica a sitio. Estas técnicas, así como otras técnicas de administración de fármacos son bien conocidas en la materia. La determinación de las dosificaciones óptimas para una situación concreta está comprendida en las capacidades de los expertos en la materia. Véase, *por ejemplo*, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21ª Ed.]

## MÉTODOS DE TRATAMIENTO

30 El anticuerpo NEO-300 o los fragmentos de unión a antígeno del mismo (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303), descritos en el presente documento, se pueden usar en los métodos para tratar el cáncer, promover la regresión del tumor, destruir células tumorales, activar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que expresan el antígeno A33 (*por ejemplo*, respuesta inmunitaria citotóxica), activar las células dendríticas, o activar la inmunidad específica de antígeno que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo a un sujeto que los necesita. Además, el anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente puede utilizarse para fabricar medicamentos para uso en el tratamiento del cáncer, promover la regresión del tumor, destruir células tumorales, activar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que expresan el antígeno A33 (*por ejemplo*, respuesta inmunitaria citotóxica), activar las células dendríticas, o activar la inmunidad específica de antígeno que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento. El anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento puede premezclarse con un transportador farmacéuticamente aceptable para fabricar una composición para el tratamiento del cáncer, promover la regresión del tumor, destruir células tumorales, activar una respuesta inmunitaria contra las células tumorales que expresan el antígeno A33 (*por ejemplo*, respuesta inmunitaria citotóxica), activar las células dendríticas, o activar la inmunidad específica de antígeno que comprende una cantidad eficaz de un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo descrito en el presente documento.

50 El cáncer tratado por el anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, descrito en el presente documento puede ser de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado. El cáncer puede ser un cáncer en el estadio 1, 2, 3 o 4. El cáncer puede haberse metastatizado. El paciente puede ser un mamífero, tal como un ser humano, que padece cáncer cuando las células tumorales expresan los antígenos A33, los antígenos A33 anómalos, y/o la tumorigénesis de células neoplásicas que expresan un antígeno A33. La cantidad suficiente para inhibir o reducir el antígeno A33 es una cantidad suficiente para mejorar el trastorno, que se puede vigilar como una disminución tanto en la progresión del cáncer como en la masa del tumor. Por ejemplo, Los anticuerpos NEO-300 con HAMA mínimo y altos niveles de ADCC pueden administrarse a dosis de 200 mg a 400 mg administradas cada dos semanas por vía I.V. a un paciente que lo necesita para tratar el cáncer metastático.

60 El paciente puede expresar niveles detectables de antígeno A33 según se detecta, *por ejemplo*, en una muestra de biopsia de tumor o en la sangre, heces, orina, o líquido linfático. Además, el paciente puede estar en riesgo de cáncer o puede ser un paciente sin síntomas. Los métodos descritos en el presente documento pueden utilizarse sobre células, *por ejemplo*, células humanas, *in vitro* o *ex vivo*. Como alternativa, el método puede llevarse a cabo sobre células presentes en un sujeto como parte de un protocolo *in vivo* (*por ejemplo*, terapéutico).

65 El anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede premezclarse con agentes quimioterapéuticos adicionales, un agente citotóxico, anticuerpos (*por ejemplo* anticuerpo monoclonal 31.1), una linfoquina, o un factor de crecimiento hematopoyético. El anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del



mismo, puede también administrarse en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina, un agente citotóxico (*por ejemplo*, un resto que inhibe el ADN, el ARN, o la síntesis de proteínas, un radionucleido, o una proteína inhibidora de ribosomas, *por ejemplo*,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica pokeweed, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de la *difteria*, cadena de ricina A, o enzima fosfolipasa citotóxica), un agente inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina, leflunomida, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, tacrolimus, o sirolimus) o un factor de crecimiento hematopoyético. El anticuerpo NEO-300 o el fragmento de unión a antígeno del mismo, puede ser una marca con una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética (*por ejemplo*, aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio), un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva.

En los métodos descritos en el presente documento, el segundo agente puede administrarse de forma simultánea o secuencial con el anticuerpo.

Los antígenos, anticuerpos, y ácidos nucleicos descritos en el presente documento se pueden usar en la fabricación de composiciones para su uso en el tratamiento del cáncer y los métodos para tratar el cáncer que incluyen, aunque no de forma limitativa, tumores sólidos y blandos, tales como carcinoma esofágico, cáncer renal, cáncer de mama, de tiroides, de bazo, de útero, de riñón, colorrectal, de pulmón, de próstata, de testículos, cáncer gástrico, de cuello de útero, de huesos, de piel, de cerebro, de cabeza y cuello, de vejiga, de cabeza y cuello, de hígado, de páncreas, melanoma, osteosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma y neoplasias malignas hematológicas tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin y linfoma no de Hodgkin, y donde el cáncer es invasivo o metastásico.

La invención proporciona métodos para tratar un sujeto con cáncer de páncreas o colon que comprende administrar un anticuerpo NEO-300 o un fragmento de unión a antígeno del mismo, a un sujeto que puede recibir terapia antihiperplásica secundaria. Los ejemplos de terapia antihiperplásica secundaria incluyen quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, fototerapia, crioterapia, terapia de toxinas, terapia hormonal, o cirugía. Por lo tanto, La invención contempla el uso de los métodos y composiciones junto con terapias anticancerosas normalizadas. El paciente que se va a tratar puede ser de cualquier edad. Un experto en la materia reconocerá la presencia y el desarrollo de otras terapias anticancerosas que se pueden usar en la conjugación con el anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo.

La determinación de la dosis está comprendida en el nivel de conocimientos de la persona normalmente experta en la materia. El anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden administrarse para un tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo, durante un periodo de uno a tres días, o se pueden usar en un tratamiento crónico, durante algunos meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en el antígeno A33 aclarado, una disminución en la progresión del cáncer, o una disminución en el tamaño del tumor.

## MÉTODOS DIAGNÓSTICOS

El anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar en los métodos diagnósticos para detectar la presencia o ausencia de un antígeno A33. El anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar en los métodos que comprenden (a) poner en contacto una muestra de ensayo con un anticuerpo, o fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un antígeno A33, y (b) evaluar los complejos de anticuerpo-epítipo, donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma. Además, el anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar en un método para detectar la presencia de un antígeno A33 en un paciente que comprende (a) administrar a dicho paciente un anticuerpo monoclonal marcado, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que se une a un antígeno A33 y (b) detectar la presencia de un antígeno A33; donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma. El complejo anticuerpo-epítipo puede detectarse mediante transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayo de flujo lateral, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación mediante difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A. La muestra puede ser una muestra de una biopsia de tejido, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, exudado inflamatorio, sangre, suero, heces, o líquido recogido del tracto colorrectal.

El anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar en los métodos diagnósticos para detectar la presencia o ausencia de un antígeno A33, donde la presencia del antígeno es indicativa de cáncer incluyendo, aunque no de forma limitativa, de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado. los métodos diagnósticos pueden utilizarse con pacientes en riesgo de cáncer o pueden ser pacientes sin síntomas.

El anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden ser recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a un antígeno A33 pueden ser un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, CDR, parátopo, o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. El anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden ser quiméricos, humanizados, antiidiotípicos, monocatenarios, bifuncionales, o coespecíficos. Los anticuerpos que se unen selectivamente a un antígeno A33 pueden ser fragmentos que se conjugan a una marca, incluyendo, aunque no de forma limitativa, una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética (por ejemplo, aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio), un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva.

Además, los anticuerpos NEO-300 o los fragmentos de unión a antígeno del mismo, pueden unirse a un soporte sólido (por ejemplo, una perla, un tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo, o tira de ensayo) tal como una matriz.

El método puede detectar pólipos colorrectales. El método puede comprender además un ensayo adicional para la presencia de tumores, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el comienzo de los tumores, tumores malignos, tumores metastásicos, y tumores no metastásicos. Por ejemplo, el método diagnóstico puede detectar células precancerosas que expresan un marcador celular que comprende un antígeno A33.

el método puede comprender tomar imágenes de un antígeno A33 mediante tomografía de emisión de positrones (PET), sistema de vigilancia CCD con poca luz, rayos x, exploración por TAC, gammagrafía, formación de imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, formación de imágenes paramagnéticas, y tomografía endoscópica de coherencia óptica.

La invención proporciona también un método para el diagnóstico genético de un riesgo de cáncer que comprende tomar una muestra de ácido nucleico de un paciente, analizar dicho ácido nucleico, que comprende con la secuencia A33 específica de cáncer, donde si la muestra de ácido nucleico del paciente corresponde a la secuencia de A33 específica de cáncer, el paciente está en riesgo de desarrollar cáncer.

Los antígenos A33 pueden utilizarse como un biomarcador del cáncer. La detección de los antígenos A33 en una muestra biológica, tal como el suero de un sujeto, células neoplásicas que se han sometido a biopsia o una muestra fecal, puede llevarse a cabo por medio del anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, una muestra biológica (*por ejemplo*, un tumor, una muestra de suero o fecal) se obtiene de un sujeto, a continuación se mide el antígeno A33 (*por ejemplo*, mediante ELISA o la PCR), y se compara con las muestras correspondientes de sujetos normales. Los métodos de medida incluyen cualquier método de detección del ácido nucleico, por ejemplo, la hibridación *in situ* utilizando el ADN de sentido contrario del antígeno A33 o las sondas de oligonucleótidos del ARNc, secuenciación de rendimiento ultraalto, tecnología nanostring, micromatrices, amplificación por círculo rodante, ligadura mediada por proximidad, PCR, qRT-PCR ChIP, ChIP-qPCR, o antígenos de unión al antígeno A33. Los niveles comparativamente altos de antígenos A33 indican la presencia y/o la gravedad del cáncer de páncreas o colon, y puede indicar metástasis o un pronóstico malo de cáncer.

El anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar en técnicas SQUID (Dispositivo superconductor de interferencia cuántica) para métodos diagnósticos. La técnica SQUID comprende unir nanopartículas de óxido de hierro a anticuerpos, que a continuación se inyectan en el paciente. Si está presente un tumor, los anticuerpos con nanopartículas conjugadas reconocen y se unen al antígeno A33 sobre las células tumorales. Véase, *por ejemplo*, Hao, et al. (2010) Journal of Physics 43: 474004. En un método SQUID, el paciente al paciente a continuación con bobinas magnéticas sensibles en un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID). Se genera un campo magnético y todas las nanopartículas metálicas se alinean en una dirección. Cuando se rompe el campo magnético, las nanopartículas emiten una señal electromagnética mientras se relajan de nuevo en su estado original. Midiendo la intensidad de la señal, se puede decir cuántas partículas metálicas, y por tanto, cuántas células tumorales, pueden estar presentes, y donde se localizan las células tumorales en el paciente. Véase, *por ejemplo*, Shao, et al. (2010) Beilstein Journal of Nanotechnology 1: 142-154.

### **Muestras y obtención de muestras**

Las muestras utilizadas en los métodos descritos en el presente documento pueden tomarse de un sujeto (paciente) e incluyen, aunque no de forma limitativa, un fluido o secreción corporal, incluyendo, aunque no de forma limitativa, sangre, suero, orina, plasma, líquido prostático, fluido seminal, semen, las secreciones externas de la piel, de los tractos respiratorio, intestinal, y genitourinario, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, esputo, saliva, leche, fluido peritoneal, fluido pleural, fluido de quistes, secreciones del sistema ductal mamario (y/o del lavado del mismo), del lavado broncoalveolar, del lavado del sistema reproductor y del lavado de cualquier otra parte del cuerpo o del sistema en el cuerpo; las muestras de cualquier órgano incluyen célula(s) o tejido(s) aislados, donde la célula o el tejido pueden obtenerse de un órgano seleccionado entre, aunque no de forma limitativa, el pulmón, el colon, ovario y/o el tejido mamario; heces o una muestra de tejido, o cualquier combinación de los mismos. En algunas

realizaciones, el término abarca muestras de constituyentes de cultivos celulares *in vivo*. Antes de someterse al ensayo diagnóstico, la muestra puede diluirse opcionalmente en un diluyente adecuado.

Se pueden utilizar numerosos métodos de recogida de tejidos o fluidos bien conocidos para recoger la muestra biológica procedente del sujeto a fin de determinar el nivel de ADN, ARN y/o polipéptido del marcador de interés en el sujeto. Los ejemplos de métodos de recogida de tejidos o fluidos incluyen, aunque no de forma limitativa, biopsia con aguja fina, biopsia con aguja, biopsia con núcleo de aguja y biopsia quirúrgica (*por ejemplo*, biopsia de cerebro), y lavado. Con respecto al procedimiento empleado, una vez que se obtiene una biopsia/muestra, puede determinarse el nivel del marcador y se puede realizar por tanto un diagnóstico.

### **Detección de antígeno A33**

La invención proporciona un método para detectar los antígenos A33 de la presente invención en una muestra biológica, que comprende: poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo que reconoce específicamente un antígeno A33 de acuerdo con la presente invención y detectar dicha interacción; donde la presencia de una interacción se correlaciona con la presencia de un antígeno A33 en la muestra biológica.

Los antígenos A33 descritos en el presente documento son ejemplos no limitantes de marcadores para el diagnóstico de una enfermedad y/o una dolencia indicativa. Cada marcador de la presente invención se puede usar solo o en combinación, para diversos usos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el pronóstico, la predicción, cribado, diagnóstico temprano, determinación de la progresión, selección de la terapia y vigilancia del tratamiento de un cáncer (por ejemplo, de páncreas, de hígado, colorrectal, de pulmón, o cáncer de mama).

Los cánceres que se pueden detectar usando los métodos descritos en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, tumores sólidos y no sólidos, cáncer de mama, de próstata, de pulmón, ovario, el colon, de útero, estómago, cuello de útero, hígado, páncreas, y donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico.

El anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo de la presente invención se pueden usar en solitario o en combinación, para diversos usos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, el pronóstico, la predicción, cribado, diagnóstico temprano, determinación de la progresión, la selección de la terapia y la vigilancia del tratamiento de los cánceres, tales como los tumores sólidos y no sólidos, cáncer de mama, de próstata, de pulmón, ovario, el colon, de útero, estómago, cuello de útero, hígado, páncreas, y donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico. Dicha combinación puede comprender opcionalmente cualquier subcombinación de marcadores, y/o una característica de combinación de al menos un marcador diferente, por ejemplo, un marcador conocido. Además, dicha combinación puede opcional y preferentemente utilizarse como se ha descrito anteriormente con respecto a determinar una relación entre una medición cuantitativa o semicuantitativa de cualquier marcador descrito en el presente documento a cualquier otro marcador descrito en el presente documento, y/o cualquier otro marcador conocido, y/o cualquier otro marcador.

Los marcadores de la presente invención pueden utilizarse opcionalmente solos o en combinación con marcadores conocidos para el cáncer de pulmón, incluyendo, aunque no de forma limitativa NPC-1, 16C3, CEA, CA15-3, beta-2-microglobulina, CA19-9, TPA, y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante de marcador, como se describe en el presente documento.

Los marcadores de la presente invención pueden utilizarse opcionalmente solos o en combinación con marcadores conocidos para el cáncer de ovario, incluyendo, aunque no de forma limitativa NPC-1, 16C3, CEA, CA125 (Mucina 16), CA72-4TAG, CA-50, CA 54-61, CA-195 y CA 19-9 en combinación con CA-125, y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante de marcador, como se describe en el presente documento.

Los marcadores de la presente invención pueden opcionalmente utilizarse solos o en combinación con marcadores conocidos para el cáncer del colon, incluyendo, aunque no de forma limitativa NPC-1, 16C3, CEA, CA19-9, CA50, y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante del marcador, como se describe en el presente documento.

Normalmente, el nivel del marcador en una muestra biológica obtenida a partir del sujeto es diferente (*es decir*, aumentado o disminuido) del nivel del mismo marcador en una muestra similar obtenida de un individuo sano (se describen ejemplos de muestras biológicas en el presente documento).

Se puede efectuar la determinación del nivel del mismo marcador en tejidos normales del mismo origen en paralelo para detectar una expresión y/o amplificación elevada y/o una expresión disminuida, del marcador, al contrario que los tejidos normales.

La presente invención proporciona también métodos, usos, dispositivos y ensayos para el diagnóstico de cánceres tales como tumores sólidos u no sólidos, cáncer de mama, de próstata, de pulmón, ovario, el colon, de útero, estómago, cuello de útero, hígado, páncreas, y donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico. Opcionalmente, se pueden usar una pluralidad de marcadores con la presente invención. La pluralidad de marcadores puede incluir

opcionalmente unos marcadores descritos en el presente documento, y/o uno o más marcadores conocidos. La pluralidad de marcadores se correlaciona a continuación preferentemente con la enfermedad o dolencia. Por ejemplo, Dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar la concentración de cada uno de la pluralidad de marcadores, y comparar individualmente cada concentración de marcador con un nivel umbral.

5 Opcionalmente, si la concentración de marcador está por encima o por debajo del nivel umbral (dependiendo del marcador y/o del ensayo diagnóstico que se está realizando), la concentración del marcador se correlaciona con la enfermedad o dolencia. Opcional y preferentemente, una pluralidad de concentraciones de marcadores se correlaciona con la enfermedad o dolencia.

10 Como alternativa, dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar la concentración de cada una de la pluralidad de marcadores, calcular un valor del índice individual basándose en la concentración de cada una de la pluralidad de marcadores, y comparar el valor del índice con un nivel umbral. Asimismo, dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar un cambio temporal en al menos uno de los marcadores, y donde el cambio temporal se utiliza en la etapa de correlación.

15 Dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar si al menos un número "X" de la pluralidad de marcadores tiene una concentración fuera de un intervalo predeterminado y/o por encima o por debajo de un umbral (como se ha descrito anteriormente). El valor de "X" puede ser opcionalmente un marcador, una pluralidad de marcadores o todos los marcadores; de forma alternativa o adicional, más bien que incluyendo cualquier marcador en el recuento de "X", pueden requerirse opcionalmente uno o más marcadores específicos de una pluralidad de marcadores para correlacionarse con la enfermedad o dolencia (de acuerdo con un intervalo y/o umbral).

20 La correlación puede comprender opcionalmente determinar si una relación de concentraciones de marcadores para dos marcadores está fuera de un intervalo y/o por encima o por debajo de un umbral. Opcionalmente, si la relación está por encima o por debajo del nivel umbral y/o fuera de un intervalo, la relación se correlaciona con la enfermedad o dolencia. Opcionalmente, se puede utilizar una combinación de dos o más de estas correlaciones con un panel individual y/o para correlacionarse entre una pluralidad de paneles. Opcionalmente, el método distingue una enfermedad o dolencia con una sensibilidad de al menos 70% a una especificidad de al menos 85% cuando se compara con sujetos normales. Como se usa en el presente documento, la sensibilidad se refiere al número de muestras positivas (con enfermedad) detectadas del número total de muestras positivas presentes; la especificidad se refiere al número de muestras positivas verdaderas (sin enfermedad) detectadas del número total de muestras negativas presentes. Preferentemente, el método distingue una enfermedad o dolencia con una sensibilidad de al menos 80% a una especificidad de al menos 90% cuando se compara con sujetos normales. Más preferentemente, el método distingue una enfermedad o dolencia con una sensibilidad de al menos 90% a una especificidad de al menos 90% cuando se compara con sujetos normales. también más preferentemente, el método distingue una enfermedad o dolencia con una sensibilidad de al menos 70% a una especificidad de al menos 85% cuando se compara con sujetos que presentan síntomas que imitan los síntomas de enfermedad o dolencia.

40 Se puede analizar un panel de marcadores de numerosas manera bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, cada miembro de un panel puede compararse con un valor "normal", o un valor que indica un resultado concreto. Un diagnóstico/pronóstico concreto puede depender de la comparación de cada marcador con este valor; como alternativa, si solo un subconjunto de marcadores esta fuera de un intervalo normal, este subconjunto puede ser indicativo de un diagnóstico/pronóstico concreto. El técnico experto comprenderá también que los marcadores diagnósticos, los marcadores diagnósticos diferenciales, los marcadores pronósticos, los marcadores de tiempo de inicio, los marcadores diferenciadores de enfermedad o dolencia, pueden combinarse en un único ensayo o dispositivo. Los marcadores pueden utilizarse también comúnmente para múltiples fines, por ejemplo, aplicando un umbral diferente o un factor de ponderación diferente al marcador para los diferentes fin(es).

50 Los paneles pueden comprender marcadores para los siguientes fines: diagnóstico de una enfermedad; diagnóstico de enfermedad e indicación de si la enfermedad está en una fase aguda y/o si se ha producido un ataque agudo de la enfermedad; diagnóstico de la enfermedad e indicación de si la enfermedad está en una fase no aguda y/o si se ha producido un ataque no agudo de la enfermedad; indicación de si se ha producido una combinación de fases o ataques agudos y no agudos; diagnóstico de una enfermedad y pronóstico de un resultado adverso posterior; diagnóstico de una enfermedad y pronóstico de una fase o ataque agudo o no agudo; progresión de la enfermedad (por ejemplo, para el cáncer, dicha progresión puede incluir, por ejemplo, la incidencia o la reincidencia de metástasis).

60 Los anteriores diagnósticos pueden incluir también opcionalmente un diagnóstico diferencial de la enfermedad para distinguir esta de otras enfermedades, incluyendo cánceres tales como tumores sólidos y no sólidos, cáncer de mama, de próstata, de pulmón, ovario, el colon, de útero, estómago, cuello de útero, hígado, páncreas, y donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico que puede caracterizar uno o más síntomas similares o idénticos.

65 uno o más indicadores diagnósticos o pronósticos se correlacionan con una dolencia o enfermedad mediante la mera presencia o ausencia de los indicado(es). En otras realizaciones, se pueden establecer nivel(es) umbral de un(os) indicadores diagnósticos o pronósticos, y el nivel de los indicador(es) en una muestra del paciente puede compararse simplemente con el(los) nivel(es) umbral. La sensibilidad y especificidad de un ensayo diagnóstico y/o

pronóstico depende de algo más que la "calidad" analítica del ensayo --dependen también de la definición de que constituye un resultado anómalo. En la práctica, las curvas características del funcionamiento del receptor, o curvas "ROC", se calculan normalmente representando gráficamente el valor de una variable frente a su frecuencia relativa en poblaciones "normales" y "enfermas", y/o mediante comparación de los resultados de un sujeto antes, durante y/o después del tratamiento.

Los antígenos A33 pueden caracterizarse como un biomarcador para detectar cánceres tales como tumores sólidos y no sólidos, cáncer de mama, de próstata, de pulmón, ovario, el colon, de útero, estómago, cuello de útero, hígado, páncreas, y donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico.

La presente invención abarca de forma opcional y preferente cualquier secuencia de aminoácidos o fragmento de anticuerpos de la misma codificado por una secuencia de ácidos nucleicos que corresponde a los antígenos A33 como se describe en el presente documento. Cualquier oligopéptido o péptido que se refiere a dicha secuencia de aminoácidos o fragmento de anticuerpos de la misma puede utilizarse también opcionalmente (de forma adicional o alternativa) como un biomarcador.

La presente invención proporciona un método para detectar un polinucleótido de la presente invención en una muestra biológica, utilizando ensayos basados en NAT, que comprende: hibridar las moléculas de ácidos nucleicos aisladas o los fragmentos de oligonucleótidos de al menos aproximadamente una longitud mínima con un material de ácido nucleico de una muestra biológica y detectar un complejo de hibridación; donde la presencia de un complejo de hibridación se correlaciona con la presencia del polinucleótido en la muestra biológica. Se describen en el presente documento ejemplos no limitantes de métodos o ensayos. La presente invención se refiere también a kits basados en dichos métodos o ensayos diagnósticos.

Además, el anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden usar para detectar el epítipo 31.1 en el antígeno A33 como un biomarcador específico para el cáncer de páncreas y colon, y puede medirse en un tejido que se ha sometido a biopsia así como en el suero y las muestras fecales de un sujeto, tal como se describe en el presente documento. Además, los procedimientos diagnósticos utilizados para detectar el cáncer colorrectal incluyen, aunque no de forma limitativa, el ensayo de sangre oculta en heces (FOBT), colonoscopia, colonografía tomográfica computerizada (colonoscopia virtual) [detecta lesiones colorrectales más grandes de 6 mm de diámetro con la misma sensibilidad que la colonoscopia], sigmoidoscopia flexible, enema de bario de doble contraste, y examen digital del recto. Winawer, et al. (1997) Am J. Gastroenterology 112: 594-642; Blum (1995) Eur. J. Canc. 31: 1369-72; Ransohoff & Sandler (2002) N. Engl. J. Med. 346: 346-44; Bruzzi (2002) N. Engl. J. Med. 346: 1672-74; y Laghi, et al. (2002) Am. J. Surg. 183: 124-31.

## INMUNOENSAYOS

El anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen al antígeno A33, se pueden usar en inmunoensayos para detectar cualitativa o cuantitativamente y analizar marcadores en una muestra. Este método comprende proporcionar un anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo; poner en contacto una muestra con el anticuerpo; y detectar la presencia de un complejo del anticuerpo unido al marcador en la muestra.

Se puede detectar un antígeno A33 y/o cuantificarse utilizando cualquiera de numerosos ensayos de unión inmunológicamente reconocidos utilizando anticuerpos NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo. Los ensayos útiles incluyen, *por ejemplo*, un ensayo de inmunoenzimático (EIA) tal como un ensayo de inmunoenzimático de adsorción (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un ensayo de transferencia Western, o un ensayo de transferencia en ranura. Véase, *por ejemplo*, las patentes de Estados Unidos números 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168. En general, una muestra obtenida de un sujeto se puede poner en contacto con el anticuerpo que se une específicamente al antígeno A33.

Opcionalmente, el anticuerpo puede fijarse a un soporte sólido para facilitar el lavado y el posterior aislamiento del complejo, antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, aunque no de forma limitativa un vidrio o plástico en la forma de, *por ejemplo*, una placa de microvaloración, una barra, una perla o una micropelota. Los anticuerpos pueden unirse a un soporte sólido.

Tras incubar la muestra con anticuerpos, la mezcla se lavó y se puede detectar el complejo marcador-anticuerpo. Esto se puede llevar a cabo incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Como alternativa, el marcador en la muestra puede detectarse utilizando un ensayo indirecto, donde, *por ejemplo*, un segundo anticuerpo marcado se utiliza para detectar el anticuerpo específico del marcador unido, y/o en un ensayo de competición o inhibición donde, *por ejemplo*, un segundo anticuerpo monoclonal que se une a un epítipo distinto del marcador se incuba simultáneamente con la mezcla.

En todos los ensayos, pueden requerirse etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar desde aproximadamente 5 segundos a varias horas, preferentemente desde aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de

incubación dependerá del formato del ensayo, del marcador, del volumen de solución, de las concentraciones. Usualmente, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque se pueden llevar a cabo en un intervalo de temperaturas (*por ejemplo*, 10°C-40°C).

5 Se puede usar el inmunoensayo para determinar una cantidad de ensayo de un marcador en una muestra de un sujeto. En primer lugar, se puede detectar una cantidad de ensayo de un marcador en una muestra utilizando los métodos de inmunoensayo descritos anteriormente. Si un marcador está presente en la muestra, formará un complejo marcador-anticuerpo con un anticuerpo que se une específicamente el marcador en las condiciones de incubación adecuadas descritas anteriormente. Puede determinarse opcionalmente la cantidad de un complejo  
10 marcador-anticuerpo comparándolo con un patrón. Tal como se ha señalado anteriormente, la cantidad de ensayo del marcador no necesita medirse en unidades absolutas, siempre que la unidad de medición pueda compararse con una cantidad y/o señal del control. Se conocen en la técnica varios inmunoensayos y el anticuerpo NEO-300 (*por ejemplo*, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo descritos en el presente documento se pueden usar en dichos inmunoensayos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, un radioinmunoensayo (RIA), un enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA), un ensayo de flujo lateral, un  
15 inmunoensayo magnético, una inmunotransferencia, una transferencia Western, ensayos de inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, y clasificación celular activada por fluorescencia (FACS). Véase Wild, (2008) [Ed.] The Immunoassay Handbook [3ª Ed.] Elsevier.

## 20 **MÉTODOS DE FORMACIÓN DE RADIOIMÁGENES**

El anticuerpo NEO-300 y los fragmentos de unión a antígeno del mismo que se unen al antígeno A33, se pueden usar en métodos de formación de radioimágenes para diagnosticar el cáncer, incluyendo el cáncer de páncreas y el  
25 cáncer colorrectal, o para vigilar la progresión de tumores. Estos métodos incluyen aunque no de forma limitativa, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT). Estas técnicas no son invasivas, y se pueden usar para detectar y/o medir una amplia variedad de acontecimientos y/o funciones de tejidos, tales como, por ejemplo, la detección de células cancerosas. SPECT puede utilizarse opcionalmente con dos marcas simultáneamente. véase la patente de Estados Unidos n.º. 6.696.686.

## 30 **APLICACIONES Y MÉTODOS COMERCIALES**

La presente invención proporciona además la producción de anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo para conseguir cantidades comerciales. El anticuerpo  
35 NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo se pueden producir a gran escala, almacenarse si es necesario, y suministrarse a hospitales, clínicas u otros centros sanitarios.

Los métodos de producción, almacenamiento y distribución del anticuerpo NEO-300 (por ejemplo NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden producirse mediante los métodos divulgados en el presente documento. Tras la producción, el anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden recogerse, purificarse y, opcionalmente,  
40 almacenarse antes del tratamiento de un paciente. Por ejemplo, una vez que un paciente presenta síntomas tales como, por ejemplo, de cáncer de páncreas, colorrectal, de esófago, oral, o cáncer de mama, un anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de unión a antígeno del mismo pueden ordenarse y proporcionarse de una manera temporalizada. Por consiguiente, la presente invención se refiere a los métodos de producir el antígeno A33 para obtener anticuerpos a escala comercial, composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al antígeno  
45 A33, así como los métodos de proporcionar (es decir, producir, opcionalmente almacenar y vender) anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al antígeno A33 para hospitales y clínicas. La producción del anticuerpo NEO-300 (por ejemplo, NEO-301, NEO-302, NEO-303) o los fragmentos de  
50 unión a antígeno del mismo puede escalarse para el uso comercial.

La presente invención proporciona también métodos para llevar a cabo un negocio farmacéutico que comprende establecer un sistema de distribución para distribuir la preparación para la venta o puede incluir establecer un grupo de ventas para comercializar la preparación farmacéutica.  
55

Todas las publicaciones (por ejemplo, bibliografía no de patentes), patentes, publicaciones de solicitudes de patentes, y solicitudes de patentes mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la materia a la cual esta invención pertenece.

## 60 **Ejemplos**

La invención que se describe ahora generalmente, será más fácilmente comprensible mediante las referencias a los siguientes ejemplos, que se incluyen meramente a fines ilustrativos de determinados aspectos y realizaciones de la presente invención y no se pretende que limiten la expresión.  
65

**Ejemplo 1****CARACTERIZACIÓN DEL ANTÍGENO A33**

- 5 El anticuerpo 31.1 es reactivo con los tejidos del cáncer de colon y páncreas y se cree que se une al antígeno A33, pero su epítipo era desconocido. Para confirmar e identificar el antígeno unido por el anticuerpo 31.1, se probó el antígeno A33 en diversas condiciones para unirse al anticuerpo 31.1. como se describe en el presente documento, se confirmó que el anticuerpo 31.1 se unía al antígeno A33 como se transformó mediante la transferencia Western, inmunoprecipitación (IP), espectroscopía de masas, la transferencia por adsorción, citometría de flujo, y ELISA.
- 10 Además, el epítipo es no lineal debido a la sensibilidad a detergentes y los resultados de la unión negativa en condiciones reductoras en la transferencia Western.

*Controles*

- 15 Se preparó una línea de células de expresión del antígeno A33 transfectando un vector que comprende un ADNc de A33 de longitud completa en una línea de células CHO negativa para A33. Las células CHO que expresaban A33 se seleccionaron y usaron como células del control positivo (A33-CHO). El anticuerpo AS33, que se une al antígeno A33, se purificó a partir de células de hibridoma. Las células A33-CHO y el anticuerpo AS33 se usaron como anticuerpo del control positivo en este estudio.

- 20 El anticuerpo 31.1 se une a A33-CHO de una manera dependiente de la dosis, pero no se une a las células CHO precursoras en la citometría de flujo. Se añadieron diferentes concentraciones de anticuerpo 31.1-biotina a 100  $\square$ 1 de células A33-CHO o CHO a  $1 \times 10^6$  células/ml en PBS en placas de 96 pocillos y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de lavar con PBS las células 3 veces, 100  $\square$ 1 de estreptavidina-FITC diluida
- 25 se añadieron a las células y se incubaron durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS tres veces, se analizaron las células mediante el programa Guava ExpressPro en un instrumento Guava EasyCyte. Se usó IgG-biotina humana como isotipo control. Los resultados mostraron una unión del anticuerpo 31.1 a las células A33-CHO dependiente de la dosis.

- 30 El anticuerpo 31.1 puede detectar el antígeno en las proteínas Ip de 31.1 procedentes de LS174T y A33-CHO, pero no en las proteínas IP de AS33 de ambas células en la transferencia western en condiciones no reductoras. AS33 se une al antígeno en las proteínas IP de 31.1 y AS33 procedentes de LS174T y A33-CHO. Sin embargo, 31.1 no detecta la proteína IP de 31.1 en condiciones reductoras mediante la transferencia Western, sugiriendo que el epítipo 31.1 es no lineal o conformacional.

- 35 El anticuerpo 31.1 puede también detectar las proteínas IP de 31.1 específicamente mediante transferencia por adsorción. Se añadieron 2  $\square$ 1 de proteínas IP de 31.1 al papel de nitrocelulosa. tras secar al aire el papel, se incubó 31.1-biotina con el papel bloqueado y lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó estreptavidina-HRP con papel lavado durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó el papel lavado con reactivo
- 40 ECL durante 1 minuto, se cubrió con una envoltura Saran y se expuso a una película de rayos X en una habitación oscura.

- Se puede detectar el A33 recombinante humano capturado en anticuerpo 31.1 por el anticuerpo AS33 en un ELISA de tipo sándwich. La placa se revistió con 31.1 a 10  $\square$ g/ml durante 1 hora a 37°C y se bloqueó con leche al 1%, EDTA-TBS 5 mM; tras lavar la placa con TBST, se añadió el antígeno A33 recombinante humano a la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de tres lavados con TBST, se añadieron diferentes
- 45 concentraciones de AS33-biotina a la placa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió estreptavidina-HRP a la placa lavada y se incubó durante 1 hora más a temperatura ambiente. Se añadió TMB y se lavó la placa durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se leyó la placa a 450 nm inmediatamente después de añadir HCl 1 N para detener la reacción. Los resultados demostraron que el antígeno A33 capturado en 31.1
- 50 comprende el antígeno, que se puede detectar con el anticuerpo AS33, sugiriendo que los anticuerpos 31.1 y AS33 dirigen diferentes epítipos del antígeno A33.

*Caracterización del antígeno A33*

- 55 Tratamiento térmico: transferir 5  $\mu$ l (microlitros) de proteína IP de LS174T 31.1 diluida con ddH<sub>2</sub>O (diluida 1:1) en tubos de la PCR; 5 tubos en total. Colocar 4 tubos en pocillos precalentados a 100°C en la máquina de la PCR y retirar un tubo cada vez a los 5, 15, 30, y 60 minutos. el tubo sin calentar es de los 0 minutos.

- 60 Digestión de la proteasa: mezclar 3  $\mu$ l de pronasa E (1 mg/ml) o ddH<sub>2</sub>O con 3  $\mu$ l de proteína IP de LS174T e incubar la mezcla a 37°C durante 24 horas. Se usó el tratamiento con ddH<sub>2</sub>O para el control. Para la oxidación del peroxidato: Mezclar 2  $\mu$ l de la oxidación del peroxidato 40 mM (disuelto en acetato de sodio 50 mM) con 2  $\mu$ l de proteína IP de LS174T 31.1 e incubar la mezcla a temperatura ambiente durante 60 minutos. se usó acetato de sodio 50 mM como tampón de control de la digestión. Para el tratamiento con 2ME y DTT: Añadir 1  $\mu$ l de 2-ME o 1  $\mu$ l
- 65 de DTT (1 M) a 4  $\mu$ l de proteína IP de LS174T 31.1 e incubar la mezcla a 95°C durante 5 minutos. Se usó ddH<sub>2</sub>O para los controles.

Las muestras tratadas se ensayaron mediante la transferencia por adsorción. Se añadieron 2 µl de proteínas IP de 31.1 tratadas al papel de nitrocelulosa. Tras secar al aire el papel, se incubó 31.1-biotina con el papel bloqueado y lavado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubó estreptavidina-HRP con papel lavado durante otros 30 minutos a temperatura ambiente. El papel lavado se incubó con reactivo ERCL durante 1 min, se cubrió con una envoltura Saran y se expuso a una película de rayos X en una habitación oscura. La proteína IP de LS174T 31.1 se usó para el control positivo en este experimento de transferencia por adsorción. Los resultados demostraron que el antígeno 31.1 es resistente al calor (99 grados C durante 5 minutos) y sensible al tratamiento de la proteasa, la oxidación del peryodato y los reactivos reductores (2-ME y DTT). Se sugirió que el antígeno 31.1 es una proteína y pueden ser necesarios los enlaces disulfuro para mantener la conformación que es reconocida por el anticuerpo 31.1.

El anticuerpo 31.1 no reacciona en cruzado con A33 recombinante de ratón en un ELISA de tipo sándwich y una tinción IHC. Los estudios de la transferencia Western sugieren que el antígeno dirigido a 31.1 tiene un peso molecular de aproximadamente 37-50 Kd. Además, la espectroscopía de masas que da como resultado las proteínas IP de 31.1 procedentes de LS174T sugiere que A33 puede ser la proteína diana. La muestra de proteína IP de 31.1 se separó en dos geles SDS-PAGE precolados al 4-15%. La banda entre 37 kD y 50 kD se cortó a partir de un gel para la espectroscopía de masas y se usó otro gel para la transferencia Western sondado con 31.1-biotina.

#### *Identificación del epítipo 31.1 en el antígeno A33*

La longitud completa de la secuencia de aminoácidos de A33 y los péptidos de la proteína IP de LS174T siguiente, donde se muestran las secuencias peptídicas resaltadas de IP de LS 174T 31.1 que están unidas por el anticuerpo monoclonal 31.1 (se identificó el 39% de la cobertura de la secuencia total de A33) (se muestra en negrita un epítipo 31.1 predicho).

```

1  MVGKMWPVLW TLCAVRVTVD AISVEIPQDV LRSQGKSVT LPCTYIITSTS
   SREGLIQWDK
61  LLLTHTERVV IWPFSNKNYI HGELYKNRVS ISNNAEQSDA SITIDQLTMA DNGTYECSVS
121 LMSDLEGNTK SRVRLI.VLVP PSKPECGIEG ETIIGNNIQL TCQSKEGSPT PQYSWKRYNI
181 LNQEQPLAQP ASGQPVSLKN ISTDTSGYYI CTSSNEEGTQ FCNITVAVRS PSMNVALYVG
241 JAVGVVAALI IIGIIIYCCC CRGKDDNIFED KEDARPNREA YEPEPEQLRE I.SREREEEDD
301 YRQEFQRSTG RESPDHLDQ (SEQ ID NO:10)

```

El anticuerpo 31.1 detectó el antígeno en las proteínas IP de 31.1 procedentes de LS 174T y A33-CHO, pero no en las proteínas IP de AS33 de ambas células en la transferencia Western en condiciones no reductoras. AS33 se une al antígeno en las proteínas IP de 31.1 y AS33 procedentes de LS 174T y A33-CHO, lo que sugirió que los anticuerpos 31.1 y AS33 dirigen diferentes epítopos del antígeno A33. Como el anticuerpo 31.1 puede no detectar la proteína IP de 31.1 en condiciones reductoras, esto sugiere que el epítipo del anticuerpo 31.1 es un epítipo no lineal.

Por lo tanto, se encontró que el epítipo del antígeno A33 unido por el anticuerpo 31.1 era resistente a calor a 99°C durante 5 minutos, hasta 15 minutos, pero se perdió la unión después de 30 y 60 minutos de calentamiento. El antígeno 31.1 se caracterizó adicionalmente mediante el tratamiento de oxidación con proteasa y peryodato. Los resultados sugieren que el antígeno 31.1 es una proteína sensible a la oxidación con proteasa y peryodato. Se encontró que el antígeno 31.1 era sensible a 2-mercaptoetanol y DTT (ambos, agentes reductores bien conocidos) en la transferencia western y la transferencia por adsorción. Por lo tanto, se cree que el epítipo 31.1 unido mediante el anticuerpo 31.1 sobre el antígeno A33 es un epítipo no lineal debido a la observación de que desaparece la banda en condiciones reductoras con 2-ME y DTT en la transferencia Western y la transferencia por adsorción.

Se encontró que el epítipo en el antígeno A33 unido mediante el anticuerpo 31.1 no era sensible a la desglicosilación con el tratamiento con N-glicanasa (PNGasa F), O-glicanasa, sialidasa, y neuraminidasa. Por el contrario, el antígeno NPC-1 es sensible al tratamiento con sialidasa y neuraminidasa. Los resultados de la desglicosilación que no están implicados restos de hidratos de carbono en la unión del anticuerpo 31.1 al epítipo 31.1.

## **Ejemplo 2**

### **Anticuerpos NEO-300 monoclonales dirigidos contra la proteína inmunógena específica de tumor**

Los anticuerpos NEO-301 descritos en el presente documento se desarrollaron contra las proteínas tumorales inmunógenas (Antígenos específicos de tumor/TSA) que se expresan en cánceres humanos como se describe en el Ejemplo 1. Los anticuerpos NEO-300 descritos en el presente documento se pueden usar para el reconocimiento temprano de A33 como un marcador diagnóstico, y el direccionamiento de dichos marcadores para la destrucción del tumor, principalmente a través de ADCC. Los anticuerpos NEO-300 descritos en el presente documento se



pueden usar en la detección y el tratamiento del cáncer de colon y páncreas (por ejemplo, los anticuerpos NEO-300 inducen la apoptosis de las células de tumores de cáncer y páncreas). Los anticuerpos NEO-300, es decir, 31.1 de murino parecieron ser en su mayor parte IgG2a. El anticuerpo NERO-301 experimento la quimerización (NEO-301) y la humanización (NEO-302). Se encontró que los anticuerpos monoclonales resultantes cambiaron sus isotipos a una IgG1 posteriormente a la quimerización o humanización, cuando se expresan en células CHO. Estos anticuerpos monoclonales quiméricos no solo eran más eficaces en el control del crecimiento del tumor, sino que minimizaron el desarrollo de una respuesta del HAMA. Debido a la especificidad de los anticuerpos NERO-300 (NEO-300 quiméricos) en el direccionamiento de las proteínas inmunógenas bien definidas que se expresaban en la membrana de las células tumorales, carecen de reactividad cruzada hacia un tejido normal, tienen una toxicidad relativamente baja cuando se administran por vía intravenosa, muestran un rápido direccionamiento de las poblaciones de células tumorales (4-6 horas *in vitro*) y destruyen trasplantes xenoinjertados (*in vivo*) en los días de la administración. Además, es posible combinar los anticuerpos NEO-300 con inmunostimulantes tales como GMCSF e IL-2 (proteínas de fusión) o conjugarlos con emisores alfa y beta.

Los anticuerpos NEO-300 quiméricos o humanizados (por ejemplo, NEO-301) cuando se administran por vía intravenosa en dosis terapéuticas altas, pueden iniciar la destrucción del tumor en horas de la administración intravenosa. Circulan con una semivida que excede los 10 días y muestran un índice de localización mejor de 10:1, donde la concentración del anticuerpo monoclonal fijado al tumor es diez veces o más que cuando permanece en circulación.

#### Método utilizado para determinar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

A 4 h. Se utilizó un ensayo de liberación de  $^{51}\text{Cr}$  o  $^{111}\text{In}$  para medir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Las células diana, tanto de líneas de células de carcinoma de colon, carcinoma de páncreas, como líneas de células de cáncer escamocelular de pulmón, se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC) en Rockville MD. Las células diana se marcaron con 200  $\mu\text{Ci}$  de cromato de sodio  $^{51}\text{Cr}$  o el equivalente en indio radiomarcado en 0,2 ml de suero de feto de ternera durante 1 hora. Se añadieron células diana ( $1 \times 10^4$  en 50  $\mu\text{l}$ ) a placas de ensayo con fondo en forma de U de 96 pocillo que contenían células mononucleares efectoras. Se evaluaron relaciones de células efectoras a células diana de 100, 50 y 25 en presencia del anticuerpo monoclonal NEO-301 en comparación con la IgG normal a concentraciones de anticuerpo monoclonal de 2,5-5,0  $\mu\text{g/pocillo}$ . Se incubaron las placas durante 4 horas a 37° en una atmósfera humidificada que contenía  $\text{CO}_2$  al 5 %. Se recogieron los sobrenadantes para el recuento gamma usando Skatron Harvester Frames. Los experimentos se llevaron a cabo por triplicado. Se calculó la lisis específica. Pareció que 5,0  $\mu\text{g/pocillo}$  de los anticuerpos NEO-301 produjeron resultados óptimos y que la relación E:T de 100:1 produjo el intervalo más alto de destrucción del tumor durante un periodo de tiempo de 4-6 horas. Se determinó la liberación espontánea midiendo la radioactividad liberada de las células diana incubadas en medio solo. Se obtuvo la radioactividad total liberable tras el tratamiento con 2,5% de Triton X-100. Otro método para tabular los datos es en términos de "unidades líticas". Pueden calcularse dichas unidades donde una unidad lítica se define como el número de células requerido para lisar el 15% de una población de  $5 \times 10^3$  células diana en un ensayo de 6 horas. A continuación se expresan los valores de las unidades líticas como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. El ensayo MTT es un ensayo de laboratorio similar para la citotoxicidad del anticuerpo usando un ensayo colorimétrico normalizado (un ensayo que mide los cambios en el color) para medir la proliferación celular (crecimiento celular). Se midió espectrofotométricamente la cantidad de MTT de color amarillo (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) oxidado a formazán de color púrpura (véase la figura). Esta oxidación tiene lugar solo cuando las enzimas reductasas mitocondriales están activas, y por tanto, la conversión está relacionada directamente con el número de células viables. La producción de formazán de color púrpura en células tratadas con un agente se mide con respecto a la producción en células del control, y se puede generar una curva de respuesta a la dosis.

Estos métodos proporcionan la capacidad de cuantificar de forma precisa la intensidad de sus capacidades de tinción, y el % de células reactivas que expresan el antígeno diana de la superficie de la célula relevante. La unión de los anticuerpos monoclonales ha variado con la población tumoral estudiada, pero las combinaciones de los anticuerpos NEO-301 han mostrado que el reconocimiento tumoral puede optimizarse para ofrecer una respuesta superior. Se utilizó la ADCC como un ensayo *in vitro* para la citotoxicidad tumoral demostrando que los anticuerpos NEO-301 se asociaron con un 50-60% o mejor tasa de destrucción. Se encontró que este proceso se producía *in vitro*, durante un periodo de tiempo de 4-6 horas. Se sometió a ensayo la tasa de destrucción de células tumorales mediante un ensayo de liberación del cromo o indio.

En un análisis de la capacidad de un anticuerpo monoclonal para hidratos de carbono tal como CA 17.1A de inducir la apoptosis en células de cáncer de colon, se comparó con NEO-301 (que se une al epítipo 31.1 en el antígeno A33). Los resultados se muestran en la Figura 3.

Para evaluar la especificidad de la respuesta ADCC a algunos tipo de tumores y a los controles, NEO-301, CA19.9 (un anticuerpo monoclonal para hidratos de carbono que muestra actividad en neoplasias de páncreas así como en algunas lesiones colorrectales) y UPC-10 (se usó un anticuerpo contra mieloma como el control) se examinaron para su capacidad de lisar líneas de células de cáncer de páncreas y colon.

**Tabla 4** Células diana marcadas con In<sup>111</sup>, se usaron anticuerpos a 5 µg/ml, se usaron PBMC como células efectoras, 4 horas de incubación a 37°C antes de la recogida.

Diana	Efactor: Relación diana	% de actividad específica de ADCC (± SEM)		
		NEO-301	CA 19-9	UPC-10 del control negativo
SW1463	100:1	51,0 ± 1,3	2,0 ± 1,2	3,4 ± 0,8
	50:1	36,0 ± 1,0	1,9 ± 0,1	1,1 ± 0,8
	25:1	24,4 ± 1,7	1,6 ± 0,3	1,3 ± 0,2
AsPC-1	100:1	30,3 ± 1,3	19,5 ± 0,4	3,2 ± 0,9
	50:1	19,3 ± 1,3	1,4 ± 0,4	0,6 ± 0,5
	25:1	12,7 ± 0,1	3,3 ± 1,1	-06 ± 1,9
H441	100:1	5,0 ± 0,4	0,6 ± 3,0	3,0 ± 1,2
	50:1	5,2 ± 3,6	1,8 ± 0,6	-0,5 ± 0,4
	25:1	6,7 ± 0,6	1,0 ± 0,2	0,1 ± 0,5
MCF-7	100:1	2,4 ± 0,3	2,5 ± 0,5	2,6 ± 0,8
	50:1	2,4 ± 0,5	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,3
	25:1	2,8 ± 0,4	2,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1

**Tabla 5** el anticuerpo monoclonal NEO-301 quimérico en un estudio secundario indica la fuerte actividad ADCC del anticuerpo monoclonal NEO-301 quimérico contra las líneas de células de cáncer de colon y de páncreas.

Línea de células tumorales	% de destrucción específica		
	Efactor: Relación diana	Control Negativo	NEO-301
<b>SW1463 (Colorrectal)</b>	100:1	3,4	<b>51,0</b>
	50:1	1,1	<b>36,0</b>
	25:1	1,3	<b>24,4</b>
<b>AsPC-1 (Páncreas)</b>	100:1	3,2	<b>30,3</b>
	50:1	0,6	<b>19,3</b>
	25:1	-0,6	<b>12,7</b>
<b>MCF-7 (Mama)</b>	100:1	2,6	<b>2,4</b>
	50:1	1,8	<b>2,4</b>
	25:1	1,7	<b>2,8</b>

A fin de evaluar el potencial para una respuesta clínica iniciada por NEO-301 (NEO-300 quimérico), se diseñó un modelo de murino *in vivo*. Se utilizó una situación terapéutica para evaluar el efecto del anticuerpo sobre los tumores establecidos completamente en ratones. Los animales del control (ratones alotímicos) se cebaron inyectando 2 millones tanto de células de adenocarcinoma de colon como de adenocarcinoma de páncreas humano (obtenidas de la ATTC) en las patas posteriores de los animales. Se estudiaron cada uno de los animales (7 por grupo) para la apariencia y la progresión del crecimiento de células tumorales. A los 10 días después de la inyección, aparecieron masas de tumores clínicos de 2-3 cm de diámetro y progresaron de tal manera que cada 10 a 15 días cada animal estaba cojeando y tenía dificultades para realizar la acción. Al final de la siguiente semana, cada animal apareció preterminal. A continuación se repitió el experimento, Para ensayar la capacidad de los anticuerpos monoclonales de controlar el crecimiento del tumor indicando la regresión de la m tumoral establecida. Se dividieron los grupos para recibir los 2 millones de células cancerosas indicadas anteriormente, mediante inyecciones subcutáneas en la pata. En el día 10º del experimento, se administró a un grupo 400 µg de una IgG humana no específica con células efectoras humanas por vía intraperitoneal. Esto se llevó a cabo como un control negativo para descartar la capacidad de la IgG no específica en presencia de células efectoras de estimular un efecto apoptótico sobre el tumor humano en crecimiento. Se administró una segunda inyección de anticuerpo en el día 11. Se administró al segundo grupo que recibió células tumorales el anticuerpo terapéutico NEO-301 sin el beneficio potencial de las células efectoras. Se empleó este segundo grupo para evaluar si algún mecanismo adicional diferente de la actividad de los linfocitos NK indujo la destrucción del tumor. El tercer grupo recibió anticuerpos monoclonales por vía intraperitoneal

más células efectoras humanas. Resultó fácilmente evidente que sin el anticuerpo monoclonal adecuado, la IgG humana no específica junto con células efectoras humanas no tuvo respuesta sobre el crecimiento del tumor, y las masas que aparecieron en la extremidad superior de los animales continuaron progresando. Los anticuerpos monoclonales terapéuticos administrados con células efectoras tienen alguna capacidad de controlar el crecimiento del tumor sugiriendo que un "segundo", mecanismo, pero menor que la ADCC podría estar entrando en juego. El anticuerpo NEO-300 puede actuar de forma secundaria como los ligandos TRAIL iniciando la apoptosis definida por la unión a la anexina V. Cuando se llevó a cabo el estudio animal más detallado evaluando el anticuerpo NEO-301 solo y en combinación con células efectoras para evaluar el inicio de la destrucción del tumor a través de numerosos medios diferentes incluyendo su función primaria en la ADCC. Véanse las Figs. 4, 5, y 6.

Se examinó el efecto de NEO-301 sobre la inducción de la apoptosis como se define por la unión a la anexina V. En el momento de la muerte celular, exactamente antes de la destrucción del ADN por el apoptosoma, la fosfoinositol serina se transporta a la superficie de la membrana de la célula donde se une a la anexina V etiquetada con una señal fluorescente.

LaFig. 4 representa gráficamente un control que utiliza IgG normal IgG para sustituir por el anticuerpo monoclonal NEO-301.

LaFig. 5 representa gráficamente el retraso del crecimiento del tumor observado cuando el anticuerpo monoclonal NEO-301 se administra en ausencia de células efectoras humanas.

LaFig. 6 representa gráficamente la capacidad del anticuerpo monoclonal NEO-301 administrado en combinación con células efectoras humanas de retrasar el crecimiento de los tumores humanos.

Se observaron los resultados del desplazamiento de la fosfoinositol serina a la membrana celular externa en donde las células de cáncer de páncreas tratadas y no tratadas se compararon para el grado de unión a la anexina V. El examen de los datos mostró que el grupo no tratado tenía una tasa de apoptosis de aproximadamente 18,22%. se encontró que esto aumentó al 36,83% de las células que experimentan apoptosis en el grupo tratado.

Se examinó el efecto de NEO-301 sobre la expresión de VEGF y se demostró que había una disminución significativa en el nivel de estos factores de crecimiento superficiales similar a la que se observó con la herceptina (Tabla 6).

**Tabla 6.** Supresión de anticuerpos de la producción de VEGF por células PACA-2 en NEO-301 y herceptina.

Anticuerpo(□m/ml)	VEGF	% de inhibición
Herceptina (100)	116,9	43,3
Herceptina (50)	166,7	19,1
NEO-301 (100)	93,3	54,8
NEO-301 (50)	121,4	41,3
0	206,0	0

Basándose en estos resultados, los anticuerpos NEO-300, solos o combinados con quimioterapia, se pueden usar para el tratamiento de los cánceres que han fracasado con la quimioterapia estar. Además, los anticuerpos NEO-300 pueden producirse en una línea de células de mamífero tal como CHO (dhfr-) a aproximadamente 1000 mg/l de un fluido de biorreactor que no contiene suero de feto de ternera. Ambos vectores plásmidos transportan una unidad de expresión *dhfr* impulsada por el promotor temprano del SV40 deficiente en potenciador. El vector se inserta en células CHO-D-SFM (células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa (dhfr)) en medio casi exento de suero suplementado con 1,0 µg/ml de metotrexato (MTX). Al final de la producción, las células han de adaptarse a medio exento de suero antes de que se produzca la purificación final del anticuerpo.

En un estudio de un único paciente con NEO-301 (NEO-300 quimérico) contra la metástasis hepática del cáncer de páncreas, la respuesta del HAMA llegó a ser mínimamente elevada en contraste a los niveles de pretratamiento. Tras 2 dosis del anticuerpo monoclonal quimérico a 25 mg y 50 mg por vía IV, el marcador sérico para Ca 19.9 disminuyó desde 3000 U a 300 U. El HAMA antes de la terapia era de 5 nanogramos/ml antes de la administración del anticuerpo monoclonal y aumentó a 7 nanogramos/l 2 semanas de la segunda dosis y de que se administrara la dosis final. Además, el anticuerpo NEO-301 demuestra una respuesta del HAMA mínima y altos niveles de ADCC. Por lo tanto, se pueden administrar dosis de anticuerpo NEO-300 de aproximadamente 200 mg a 400 mg cada dos semanas por vía I.V. a un paciente y pueden ser eficaces en controlar el cáncer de páncreas o colorrectal metastásico.

**Ejemplo 3**

este ejemplo describe la humanización del anticuerpo 31.1 quimérico (NEO-301) descrito en los anteriores ejemplo. Se llevó a cabo la humanización a fin de producir un anticuerpo que tenía un menor riesgo de inducir respuestas inmunitarias cuando se usó *in vivo* en seres humanos para fines terapéuticos o diagnósticos.

Se produjeron cuatro secuencias de cadenas pesadas humanizadas (que se muestran en las FIGS. 1A-D) y se produjeron cuatro secuencias de cadenas ligeras (que se muestran en las FIGS. 2A-D). Se sintetizaron las secuencias de codificación para cada una y se subclonaron en el vector PcDNA3.1(+).

Métodos para el cribado de 31.1:

ELISA de IgG humana, ELISA de unión a rH-GPA33, Citometría de flujo celular (LS174T o AsPAC1), Se utilizaron la tinción IHC (LS174T FFPE, tumor FFPE y secciones de tumor congeladas) y la tinción de azul de Coomassie del gel SDS-PAGE para el cribado. El anticuerpo en el sobrenadante del cultivo se purificó mediante la purificación de la proteína A/G y se disolvió en tampón PBS tras diálisis tres veces. Se mantuvieron alícuotas de los anticuerpos a -20 grados durante el almacenamiento.

Se sometieron a ensayo dieciséis anticuerpos que comprenden combinaciones de diferentes HC y LC 31.1 humanizados diseñados, junto con la construcción a-31.1 adicional, 31.1 quimérica y 31.1 de murino, como se muestra en la Tabla 5 a continuación. Cada combinación se produjo mediante transfección transitoria utilizando el Kit del Sistema de Expresión Expi293 (Gibco, n.º de cat. A14635). Los sobrenadantes de cultivo de 6 días procedentes de la transfección transitoria de 2 ml se usaron para el cribado inicial para examinar la función de aquellos anticuerpos; Se usó el lote n.º 3310 de 31.1 quimérico para el patrón de referencia. Métodos ELISA de la IgG humana, ELISA de unión a rH-GPA33, citometría de flujo de células LS174T, Se usaron la tinción IHC sobre secciones de LS174T FFPE y la tinción del azul de Coomassie del gel SDS-PAGE para el cribado inicial. En la Tabla 5.31.1 se resumen la producción de anticuerpos de diferentes combinaciones y resultados de cribado. Catalent lote n.º 3310 es 31.1 quimérico y se utiliza como control positivo.

**Tabla 5.** resumen de la producción de 31.1 humanizado y funciones de diferentes combinaciones de cadenas de anticuerpos 31.1 humanizados en la transfección transitoria

Muestra ID	Descripción	Rendimiento (ug/ml) de ELISA de H IgG	Valor DO del ELISA de unión a rH-GPA33 (2ug/ml de 31.1)	Flujo de MFI LS174T (0,37ug/ml)	Puntuación H de IHC LS174T FFPE (20 ug/ml)
1	cdr-HC + cdr-LC	260,1	0,80	878	0
2	cdr-HC + abb-LC	260,1	0,86	821	0
3	cdr-HC + sdr-LC	360,5	0,29	520	0
4	cdr-HC + ven-LC	165,5	1,27	726	0
5	abb-HC + cdr-LC	340,3	0,85	804	240/100*
6	abb-HC + abb-LC	558	0,74	628	230/240
7	abb-HC + sdr-LC	617,1	0,20	481	120
8	abb-HC + ven-LC	280,5	1,20	934	125
9	sdr-HC + cdr-LC	712,3	0,07	6,65	150
10	sdr-HC + abb-LC	697,3	0,07	6,2	240/115

ES 2 667 333 T3

Muestra ID	Descripción	Rendimiento (ug/ml) de ELISA de H IgG	Valor DO del ELISA de unión a rH-GPA33 (2ug/ml de 31.1)	Flujo de MFI LS174T (0,37ug/ml)	Puntuación H de IHC LS174T FFPE (20 ug/ml)
11	sdr-HC + sdr-LC	826,2	0,06	5,6	160
12	sdr-HC + ven-LC	390,8	0,06	10,6	30
13	ven-HC + cdr-LC	420,5	1,27	1149	20
14	ven-HC + abb-LC	295,9	1,44	1060	125/30
15	ven-HC + sdr-LC	650,1	0,46	689	90
16	ven-HC + ven-LC	209,5	1,74	966	0/0
17	A-31.1	3,1	0,06	7,6	0
18	31.1 quimérico	10,5	0,38	116	70
19	31.1 de ratón	102	UD	UD	0
	31.1 Catalent Lote n.º 3310		0,99	985	0

\*resultados de repetición

Las producciones de la IgG humanizada variaron de 165,5 ug/ml a 826.2 ug/ml excepto A-31.1 y 31.1. quimérico. Se obtuvieron 102 ug/ml de IgG de murino. Las capacidades de unión comparables con el lote 3310 de 31.1 quimérico ensayado mediante el ELISA de unión a rHGPA33 y la citometría de flujo LS174T se observaron en la combinación cdr-HC, abb-HC y ven-HC con cuatro LC diferentes excepto sdr-HC.

5

Se obtuvieron las tinciones positivas en los bloques de tejidos LS174T FFPE en unos pocos de los sobrenadantes con mala reproducibilidad excepto un sobrenadante procedente de abb-HC y abb-LC.

10 Basándose en los resultados de cribado iniciales, el anticuerpo n.º 5 (abb31.1-HC+cdr31.1-LC, es decir, las SEQ ID NOS:75 y 84) y el anticuerpo n.º 6 (abb31.1-HC-abb31.1-LC, es decir, las SEQ ID NOS:75 y 85) se seleccionaron para una futura caracterización. Se produjo anticuerpo adicional mediante transfección transitoria de un volumen de 240 ml (120 ml X 2 matraces, cada uno). El motivo para la selección n.º 5 y n.º 6 es que ambos anticuerpos trabajaron en la tinción IHC sobre secciones de FFPE LS174T con una producción de anticuerpo relativamente alta, unión moderada a rH-GPA33 y MFI en citometría de flujo. Se utilizó la tinción del azul de Coomassie del gel SDS-PAGE para examinar la pureza y la integridad de los anticuerpos n.º 5, n.º 6 purificados y n.º 5, n.º 6 biotinilados. Como se muestra en la FIG. 7, Se observó la pureza buena de estos anticuerpos en condiciones no reductoras (izquierda), y se mostró la integridad de la cadena ligera y la cadena pesada en la condición reductora (derecha) en todos los anticuerpos ensayados.

15

20 Se ensayaron las funciones de 31.1 n.º 5, n.º 6 humanizados y n.º 5 y n.º 6 biotinilados mediante el ELISA de unión a rH-GPA33 y la citometría de flujo. El 31.1 quimérico y el 31.1 de murino se usaron como control. En la FIG. 8 se muestran los resultados del ELISA de unión. Se obtuvo la misma capacidad de unión de h31.1 n.º 5 y 31.1 quimérico en el ELISA de unión y se confirmó mediante citometría de flujo en la línea de células de cáncer de páncreas (AsPC-1) Y la línea de células de cáncer de colon (LS174T). En la Tabla 6 se resumen los resultados de ambos ensayos de la función *in vitro*.

25

**Tabla 6.** Resultados del ELISA de unión y la citometría de flujo usando el anticuerpo 31.1 quimérico, 31.1 n.º 5, n.º 6 humanizados y n.º 5, n.º 6 biotinilados.

	CE50 del ELISA de unión (ng/ml)	CE 50 de la citometría de flujo (ng/ml) AsPC-1	CE50 de la citometría de flujo (ng/ml) AsPC-1	CE50 de la citometría de flujo (ng/ml) LS-174T
31.1 quimérico n.º 3310	696,9	140,88	96,65	77,73
H 31.1 n.º 5	396,4	235,05	122,5	62,53
H 31.1 n.º 6	1234,7	276,08	151,6	80,91
H31.1 n.º 5-biotina	679,2	407,88	UD	UD
H31.1 n.º 6-biotina	12790,3	367,56	UD	UD
31.1 de murino	633,2	UD	97,43	62,82

5 Se llevó a cabo la tinción IHC con h31.1 n.º 5 y n.º 6. No hubo unión en los bloques de tejido FFPE de cáncer de colon y cáncer de intestino delgado, los mismos que 31.1 quimérico.

10 Tras examinar el segundo ciclo de caracterización y función de h31.1, se observó que hubo agregación en el n.º 5 y no hubo unión de 31.1 en los bloques de tejido FFPE en la tinción IHC. Se llevó a cabo un tercer ciclo de transfección transitoria para dar como resultado suficiente 31.1 humanizado para el análisis de la función *in vitro* e *in vivo*.

Análisis funcional de h31.1 a partir de la combinación del n.º 11 y el n.º 16

15 Para obtener suficiente material de 31.1 humanizado para analizar la función vigorosamente incluyendo el estudio animal, se seleccionó una combinación de vectores de cadena pesada y cadena ligera del anticuerpo h31.1 n.º 16 (ven31.1-HC + ven31.1-LC, es decir, las SEQ ID NOS:77 y 87) debido a la alta afinidad en el ELISA de unión y la citometría de flujo y se utilizó para la transfección transitoria de 480 ml (240 ml X 2 matraces). Para el control, el anticuerpo 31.1 n.º 11 (sdr31.1-HC + sdr31.1-LC, es decir, las SEQ ID NOS:76 y 86) se utilizó para la transfección transitoria debido al resultado del primer ciclo de transfección transitoria; alto rendimiento sin capacidad de unión en el ELISA de unión y la citometría de flujo.

20 Tras la purificación de la proteína A/G, no se observó agregación en el anticuerpo h31.1 n.º 11 y el anticuerpo h31.1 n.º 16. Se produjeron un total de 149,6 mg de anticuerpo h31.1 n.º 16 (4,4 mg/ml X 34 ml) y 121 mg de anticuerpo h31.1 n.º 11 (5,5 mg/ml X 22 ml). En la FIG. 9 se muestran los resultados de la pureza e integridad del anticuerpo; las condiciones no reductoras en la parte izquierda, las condiciones reductoras en la parte derecha. Se utilizaron 25 31.1 de murino y 31.1 chi del lote n.º 3310 como referencia.

30 se observó una afinidad de unión dependiente de la dosis comparable del anticuerpo h31.1 humanizado 31.1 n.º 16 con el anticuerpo 31.1 quimérico del lote n.º 3310 en el ELISA de unión rH-GPA33 y la citometría de flujo, como se muestra en la FIG 10 (resultados del ELISA) y la Tabla 7 (resultados de la citometría de flujo).

**Tabla 7.** Resultados de la citometría de flujo predecibles en dos experimentos separados utilizando anticuerpo 31.1 de murino (m31.1), anticuerpo 31.1 quimérico (Chi31.1), anticuerpo h31.1 humanizado y anticuerpo 31.1 n.º 11, y anticuerpo h31.1 humanizado n.º 16.

31.1 conc. (ng/ml)	MFI de unión a h31.1 a AspC-1 mediante la citometría de flujo							
	m31.1	m31.1	Chi31.1	Chi31.1	h31.1 n.º 11	h31.1 n.º 11	h31.1 n.º 16	h31.1 n.º 16
5000	1101	1114	1148	1170	117	117	1242	1289
1666,7	1327	1330	1292	1247	38,9	39	1417	1530
555,6	1396	1322	1264	1323	16,2	16,6	1515	1545
185,2	1045	1049	1056	1081	8,2	8,2	1040	1046
61,7	562	552	634	619	5,9	5,3	487	466

MFI de unión a h31.1 a AspC-1 mediante la citometría de flujo									
31.1 conc. (ng/ml)	m31.1	m31.1	Chi31.1	Chi31.1	h31.1 n.º 11	h31.1 n.º 11	h31.1 n.º 16	h31.1 n.º 16	h31.1 n.º 16
20,6	226	216	269	262	4	4	182	181	
6,9	86	81	104	103	3,6	3,6	72	69	
2,3	40	37	48	46	3,4	3,5	29,9	30,2	
0	4,2	4,7	3,8	3,6	3,6	3,6	3,6	3,6	3,5

En la FIG.11 se muestran la unión representativa de 31.1 con células AsPC-1 mediante citometría de flujo con una concentración de 5000 ng/ml (curva más a la derecha), 185 ng/ml (tercera curva de la izquierda) y 20,6 ng/ml (segunda curva de la izquierda) y el control de la IgG humana (rojo, más a la izquierda).

5 No hubo tinción IHC positiva sobre las secciones de tejido del tumor FFPE con 31.1 de murino, 31.1 quimérico y 31.1 humanizado, lo que confirmó el hallazgo previo de los inventores. Se observó tinción IHC positiva cuando se aplican estos tres anticuerpos sobre secciones de tumor congeladas. Se observaron resultados comparables entre el anticuerpo 31.1 de murino, el anticuerpo 31.1 quimérico y el anticuerpo 31.1 humanizado n.º 16, el anticuerpo 31.1 humanizado n.º 11 se usó como control negativo. Los datos brutos, la fotografía y el resumen de los resultados se relacionan en la Tabla 8 y la FIG. 12.

**Tabla 8.** Resumen de los resultados de IHC.

	Positivo n.º/Panc ca n.º	Positivo n.º/Colon ca n.º
m31.1	2/5	4/4
Chi 31.1	2/5	3/3
h31.1 n.º 16	2/5	4/4
h31.1 n.º 11	0/4	0/4

15 Se ensayó la función de destrucción de tumores de h31.1 procede de una combinación del anticuerpo n.º 6 y el anticuerpo n.º 16 con 31.1 quimérico mediante el ensayo de la ADCC utilizando la línea de células AsPC-1 de cáncer de páncreas como células diana, IgG humana como control negativo. Como se muestra en la FIG. 13, se obtuvo una lisis específica de tumor comparable del anticuerpo n.º 16 y el anticuerpo n.º 6 en comparación con 31.1 quimérico, indicando que la humanización de 31.1 no afecta adversamente la unión de 31.1 y la función de ADCC *in vitro*.

20 Se ensayó la función de H31.1 ADCC *in vivo* en un modelo de ratón con xenoinjerto de AsPC-1 con el anticuerpo h31.1 n.º 16. Se obtuvo una reducción significativa del volumen del tumor desde el día 16 hasta el día 23 con valores p de 0,047 a 0,003 después de tres inyecciones de anticuerpos tras inyecciones de PBMC en 7 días en comparación con inyecciones de H IgG y PMBC como se muestra en la FIG. 14.

<110> Precision Biologics, Inc.  
Wang, Xue-Ping

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES HUMANIZADOS Y MÉTODOS DE USO PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE COLON Y PÁNCREAS

<130> 43282.3013

<141> 30-12-2013

<150> 61/747.067

<151> 28/12/2012

<160> 94

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 307

<212> PRT

ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Antígeno NPC-1 (variante 1)

5

<400> 1

Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg Asp Cys His Leu Arg Cys Thr  
 1 5 10 15

Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro Ser Pro Gly Pro His Gly  
 20 25 30

Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile  
 35 40 45

Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser  
 50 55 60

His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu Gly Gln Val Val Gln Cys Ser  
 65 70 75 80

Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe  
 85 90 95

Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro  
 100 105 110

Lys Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro  
 115 120 125

Ser Gly Arg Ala Thr Ser Pro Thr Gln Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys  
 130 135 140



ES 2 667 333 T3

Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln  
145 150 155 160

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr  
165 170 175

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln  
180 185 190

Thr Ser Ile Ser Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr  
195 200 205

Ser Ser Thr Ile Ser Ala Arg Thr Thr Ser Ile Ile Ser Ala Pro Thr  
210 215 220

Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Thr Thr  
225 230 235 240

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln  
245 250 255

Thr Ser Lys Thr Ser Ala Ala Thr Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Gly  
260 265 270

Thr Thr Pro Ser Pro Val Thr Thr Thr Ser Thr Ala Ser Val Ser Lys  
275 280 285

Thr Ser Thr Ser His Val Ser Val Ser Lys Thr Thr His Ser Gln Pro  
290 295 300

Val Thr Arg  
305

<210> 2  
<211> 281  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Antígeno NPC-1 (variante 2)

<400> 2

Gly Thr His Thr Thr Pro Val Thr Arg Asn Cys His Pro Arg Cys Thr  
1 5 10 15

Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro Ser Pro Gly Pro His Gly  
20 25 30

ES 2 667 333 T3

Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile  
 35 40 45

Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg Leu Gln Cys Arg Ala Lys Ser  
 50 55 60

His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu Gly Gln Val Val Gln Cys Ser  
 65 70 75 80

Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe  
 85 90 95

Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro  
 100 105 110

Arg Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro  
 115 120 125

Ser Gly Arg Ala Ile Ser Pro Thr Gln Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys  
 130 135 140

Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln  
 145 150 155 160

Thr Ser Thr Thr Tyr Ala His Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr  
 165 170 175

Ala Arg Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Arg Thr Thr Ser Ala Ser Pro  
 180 185 190

Ala Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Asn Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr  
 195 200 205

Thr Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ala Pro Thr  
 210 215 220

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr  
 225 230 235 240

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser Ser Pro Gln  
 245 250 255

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly  
 260 265 270

Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr  
 275 280

<210> 3  
 <211> 16  
 <212> PRT

ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Epítopo MUC5AC NPC-1 (1)

5 <400> 3

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro  
 1 5 10 15

10 <210> 4  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Epítopo MUC5AC NPC-1 (2)

<400> 4

Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro  
 1 5 10 15

20 <210> 5  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Epítopo CEACAM5 16C3

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(67)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

35 <400> 5

Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 35 40 45

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 50 55 60

Xaa Xaa Xaa Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr Gly  
 65 70 75 80

ES 2 667 333 T3

Leu Asn Arg Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr  
85 90

5 <210> 6  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Péptido que flanquea el extremo N del epítipo CEACAM 16C3  
 10 <400> 6

Gly Pro Asp Ala Pro Thr Ile  
1 5

15 <210> 7  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 20 <220>  
 <223> Péptido que flanquea el extremo C de CEACAM5 16C3  
 <400> 7

Gly Ser Tyr Thr Cys Gln Ala His Asn Ser Asp Thr Gly Leu Asn Arg  
1 5 10 15

25 Thr Thr Val Thr Thr Ile Thr Val Tyr  
20 25

30 <210> 8  
 <211> 92  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Epítipo CEACAM6 16C3

35 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (8)..(67)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

40 <400> 8

Gly Pro Asp Gly Pro Thr Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

ES 2 667 333 T3

		35		40		45										
	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	
	50					55					60					
	Xaa	Xaa	Xaa	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr	Gly
	65					70					75					80
	Leu	Asn	Arg	Thr	Thr	Val	Thr	Met	Ile	Thr	Val	Ser				
					85						90					

5 <210> 9  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido que flanquea el extremo C de CEACAM6  
 <400> 9

	Gly	Ser	Tyr	Met	Cys	Gln	Ala	His	Asn	Ser	Ala	Thr	Gly	Leu	Asn	Arg
	1				5					10					15	
	Thr	Thr	Val	Thr	Met	Ile	Thr	Val	Ser							
				20					25							

15 <210> 10  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20 <220>  
 <223> Antígeno A33  
 <400> 10

ES 2 667 333 T3

Met Val Gly Lys Met Trp Pro Val Leu Trp Thr Leu Cys Ala Val Arg  
 1 5 10 15

Val Thr Val Asp Ala Ile Ser Val Glu Thr Pro Gln Asp Val Leu Arg  
 20 25 30

Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser  
 35 40 45

Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr  
 50 55 60

His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile  
 65 70 75 80

His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg Val Ser Ile Ser Asn Asn Ala Glu  
 85 90 95

ES 2 667 333 T3

Gln Ser Asp Ala Ser Ile Thr Ile Asp Gln Leu Thr Met Ala Asp Asn  
100 105 110

Gly Thr Tyr Glu Cys Ser Val Ser Leu Met Ser Asp Leu Glu Gly Asn  
115 120 125

Thr Lys Ser Arg Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro  
130 135 140

Glu Cys Gly Ile Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu  
145 150 155 160

Thr Cys Gln Ser Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys  
165 170 175

Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser  
180 185 190

Gly Gln Pro Val Ser Leu Lys Asn Ile Ser Thr Asp Thr Ser Gly Tyr  
195 200 205

Tyr Ile Cys Thr Ser Ser Asn Glu Glu Gly Thr Gln Phe Cys Asn Ile  
210 215 220

Thr Val Ala Val Arg Ser Pro Ser Met Asn Val Ala Leu Tyr Val Gly  
225 230 235 240

Ile Ala Val Gly Val Val Ala Ala Leu Ile Ile Ile Gly Ile Ile Ile  
245 250 255

Tyr Cys Cys Cys Cys Arg Gly Lys Asp Asp Asn Thr Glu Asp Lys Glu  
260 265 270

Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala Tyr Glu Glu Pro Pro Glu Gln Leu  
275 280 285

Arg Glu Leu Ser Arg Glu Arg Glu Glu Glu Asp Asp Tyr Arg Gln Glu  
290 295 300

Glu Gln Arg Ser Thr Gly Arg Glu Ser Pro Asp His Leu Asp Gln  
305 310 315

<210> 11  
<211> 56  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Fragmento 1 espec de masa del antígeno A33

ES 2 667 333 T3

<400> 11

Ala Ser Gln Gly Lys Ser Val Thr Leu Pro Cys Thr Tyr His Thr Ser  
1 5 10 15

Thr Ser Ser Arg Glu Gly Leu Ile Gln Trp Asp Lys Leu Leu Leu Thr  
20 25 30

His Thr Glu Arg Val Val Ile Trp Pro Phe Ser Asn Lys Asn Tyr Ile  
35 40 45

His Gly Glu Leu Tyr Lys Asn Arg  
50 55

- 5 <210> 12
- <211> 67
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 10 <220>
- <223> Fragmento 2 espec de masa del antígeno A33

<400> 12

Val Arg Leu Leu Val Leu Val Pro Pro Ser Lys Pro Glu Cys Gly Ile  
1 5 10 15

Glu Gly Glu Thr Ile Ile Gly Asn Asn Ile Gln Leu Thr Cys Gln Ser  
20 25 30

Lys Glu Gly Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys Arg Tyr Asn Ile  
35 40 45

Leu Asn Gln Glu Gln Pro Leu Ala Gln Pro Ala Ser Gly Gln Pro Val  
50 55 60

Ser Leu Lys  
65

- 15
- <210> 13
- <211> 55
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- 20 <220>
- <223> Fragmento 3 espec de masa del antígeno A33

25 <400> 13



ES 2 667 333 T3

Asp Asp Asn Thr Glu Asp Lys Glu Asp Ala Arg Pro Asn Arg Glu Ala  
 1 5 10 15  
 Tyr Glu Glu Pro Pro Glu Gln Leu Arg Glu Leu Ser Arg Glu Arg Glu  
 20 25 30  
 Glu Glu Asp Asp Tyr Arg Gln Glu Glu Gln Arg Ser Thr Gly Arg Glu  
 35 40 45  
 Ser Pro Asp His Leu Asp Gln  
 50 55

5 <210> 14  
 <211> 965  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1  
 <400> 14

atgagaatac cattaattag ctagggacca aaattcaaag acaaaatgga ttttcaggtg 60  
 cagattttca gcttcctgct aatcagtgcc tcagtcatac tgtccagagg acaagttggt 120  
 ctcaaccagt ctccagtaat catgtctgca tctccagggg agaaggtcac catgacctgc 180  
 agtgccagct caagtataag ttacatgtac tggtagcagc agaagccagg cacctcccc 240  
 aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tccttgctcg cttcagtggc 300  
 agtgggtctg ggacctotta ttctctcaca atcagcaaca tggaggctgg agatgctgcc 360  
 acttattact gccatcagcg ggattcttac ccatggacgt tcggtggagg caccaacctg 420  
 gaaatcaaac gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag 480  
 ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctacct caaagacatc 540  
 aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact 600  
 gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac 660  
 gagtatgaac gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcacct 720  
 attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtgt tagagacaaa ggtcctgaga cgccaccacc 780  
 agctccccag ctocatoccta tcttcccttc taaggctcttg gaggcttccc cacaagcgac 840  
 ctaccactgt tggggtgctc caaacctcct ccccacctcc ttctctctct cctccctttc 900  
 cttggctttt atcatgctaa tatttgacaga aaatattcaa taaagtgagt ctttgcactt 960  
 gaaaa 965

15 <210> 15  
 <211> 235  
 <212> PRT

# ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1

5

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (46)..(55)

<223> CDR1

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (71)..(77)

<223> CDR2

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (110)..(118)

<223> CDR3

20

<400> 15

ES 2 667 333 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Asn Met Glu Ala Gly Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg  
 100 105 110

Asp Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 130 135 140

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 165 170 175

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 195 200 205

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 210 215 220

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 225 230 235

<210> 16  
 <211> 10

ES 2 667 333 T3

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> CDR1 de la cadena ligera de NPC-1

<400> 16

**Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr**  
**1 5 10**

10 <210> 17  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena ligera de NPC-1

<400> 17

20 **Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
**1 5**

25 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo NPC-1

<400> 18

**His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr**  
**1 5**

35 <210> 19  
 <211> 1520  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1

<400> 19

ES 2 667 333 T3

ttttccatcc tcttctcata gagcctccat cagacatgg ctgtcctggc actgctcctc 60  
 tgcctgggtga cattoccaaag ctgtgtcctg tcccaggtgc agctgaagga gtcaggacct 120  
 gacctgggtgg cgcctcaca gagcctgtcc atcacatgca ctgtctcagg attctcatta 180  
 agcaaatttg gtgtaaaactg ggttcgccag cctccaggaa agggctctgga gtggctggga 240  
 gtaatatggg gtgacgggag cacaagttat aattcaggtc tcatatcaag actgagcatc 300  
 agcaaggaga actccaagag ccaggttttc ttaaaaactga acagtctgca agctgatgac 360  
 acagccacat actactgtgt caaacggggg ggtgactact ggggtcacgg aacctcagtc 420  
 accgtctcct cagccaaaac gacaccccca tctgtctatc cactggcccc tggatctgct 480  
 gccaaaacta actccatggg gacctggga tgctgtgca agggctatct ccctgagcca 540  
 gtgacagtga cctggaactc tggatccctg tccagcgggtg tgacacacct ccagctgtc 600  
 ctgcagtctg acctctacac tctgagcagc tcagtgactg tcccctccag cacctggccc 660  
 agcgagaccg tcacctgcaa cgttgcccac cggccagca gcaccaaggt ggacaagaaa 720  
 attgtgcca gggattgtgg ttgtaagcct tgcatatgta cagtcccaga agtatcatct 780  
 gtcttcatct tcccccaaa gcccaaggat gtgctacca ttactctgac tcctaaggtc 840  
 acgtgtgttg tggtagacat cagcaaggat gatcccagag tccagttcag ctggtttgta 900  
 gatgtggagg tgacacagc tcagacgcaa ccccgggagg agcagttcaa cagcacttc 960  
 cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa 1020  
 tgcagggtca acagtgcagc tttccctgcc cccatcgaga aaacctctc caaaacaaa 1080  
 ggcagaccga aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag 1140  
 gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag 1200  
 tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctgagcccat catggacaca 1260  
 gatggctctt acttctgcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggaggcagga 1320  
 aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac tgagaagage 1380  
 ctctcccact ctctggtaa atgatcccag tgccttggga gccctctggt cctacaggac 1440  
 tctgacacct acctccccc ctccctgtat aaataaagca cccagcaactg ccttgggacc 1500  
 ctgcaaaaaa aaaaaaaaaa 1520

5 <210> 20  
 <211> 456  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1  
 <220>

ES 2 667 333 T3

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (49)..(54)  
 <223> CDR1

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (69)..(84)  
 <223> CDR2

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (114)..(121)  
 <223> CDR3

15 <400> 20

Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

Ser Lys Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln  
 85 90 95

Val Phe Leu Lys Leu Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Thr Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Val Lys Pro Gly Gly Asp Tyr Trp Gly His Gly Thr Ser Val  
 115 120 125

Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala  
 130 135 140

Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu  
 145 150 155 160

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly

ES 2 667 333 T3

165 170 175  
 Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp  
 180 185 190  
 Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro  
 195 200 205  
 Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys  
 210 215 220  
 Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile  
 225 230 235 240  
 Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro  
 245 250 255  
 Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val  
 260 265 270  
 Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val  
 275 280 285  
 Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln  
 290 295 300  
 Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln  
 305 310 315 320  
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala  
 325 330 335  
 Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro  
 340 345 350  
 Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala  
 355 360 365  
 Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu  
 370 375 380  
 Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr  
 385 390 395 400  
 Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr  
 405 410 415

ES 2 667 333 T3

Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe  
 420 425 430

Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys  
 435 440 445

Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 450 455

5 <210> 21  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo NPC-1  
 <400> 21

Ser Lys Phe Gly Val Asn  
 1 5

15 <210> 22  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena pesada de NPC-1  
 <400> 22

25 Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Ile Ser  
 1 5 10 15

30 <210> 23  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo NPC-1  
 <400> 23

Cys Val Lys Pro Gly Gly Asp Tyr  
 1 5

40 <210> 24  
 <211> 737  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1 Chi  
 <400> 24



ES 2 667 333 T3

gcatagatct gccacatgg actttcaggt ccagatattt agctttctat tgattagcgc 60  
 ctctgtcatt ctgagtaggg ggcaggtggt gctcaccag tctccagtga tcatgtcagc 120  
 ctcaccagga gaaaaagtga ctatgacctg ctcagcatcc tccagcatca gttacatgta 180  
 ctggtaccag cagaagccag gcacctcgcc caagcgttg atctacgata cttccaagct 240  
 ggcaagtggg gtacccgcac gcttcagtgg aagtggctcc ggaacctcgt acagtttgac 300  
 catttcaaat atggaagctg gggacgcagc tacatattat tgccaccaga gagactccta 360  
 cccgtggacc ttcggaggcg gtactaattt agagatcaag aggaccgtag ccgctccttc 420  
 cgtgttcate tttccccctt ccgacgaaca actgaaaagc ggtacagcct ccgtgggttg 480  
 tctgctgaac aacttctacc cccgggaggc taaagttcag tggaaggttg acaatgctct 540  
 gcagtcaggc aactctcaag agagcgtcac ggagcaagat agcaaagatt ctacatattc 600  
 tctctcttct acacttacac ttagcaaggc cgattatgag aagcacaagg tgtatgcctg 660  
 cgaggtgact catcagggtc tttcttctcc tgtcactaaa agcttcaacc gaggcgaatg 720  
 ttgatgaaga tcttacg 737

5 <210> 25  
 <211> 235  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1 chi con el péptido de señalización

<220>  
 <221> SEÑAL  
 <222> (1)..(22)

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (46)..(55)  
 <223> CDR1

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (71)..(77)  
 <223> CDR2

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (110)..(118)  
 <223> CDR3

30 <400> 25

ES 2 667 333 T3

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ile Leu Ser Arg Gly Gln Val Val Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile  
 20 25 30

Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser  
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser  
 50 55 60

Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Asn Met Glu Ala Gly Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Arg  
 100 105 110

Asp Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys  
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 26  
 <211> 10  
 <212> PRT

ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo NPC-1 chi

5

<400> 26

**Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr**  
**1 5 10**

10

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo NPC-1 chi

<400> 27

**Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser**  
**1 5**

20

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo NPC-1 chi

30

<400> 28

**His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr**  
**1 5**

35

<210> 29

<211> 1418

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1 chi

<400> 29

ES 2 667 333 T3

gagcgggtacc gccaccatgg cagtgtctggc ccttcttctta tgtctggtga ccttcccata 60  
ctgcgctcctg agccaggtac aactgaagga gtcgggcccc gacctagtgg ctccgtcaca 120  
atcactctcc attacgtgca ctgtctccgg cttctctttg tctaaattcg gcgtgaattg 180  
gggtgcgacag cccccggga aggggcttga gtggttagga gttatctggg gtgacggctc 240  
aaccagctac aactcaggac taatctcacg cttgtcaatt tcaaaggaga attcaaagtc 300  
tcagggtgttc cttaagctca actcgtctgca agccgacgat accgcaacct attactgctg 360  
caaacctggc ggggactact ggggccatgg cacctccgtc acagtgagtt ccgcatccac 420  
aaaggggtccc agtggtttttc ctttggcgcc ctctagcaaa tcgacatctg gcggcacagc 480  
cgcacttggg tgcttggtta aagactactt cccgaaccg gtgacagtat cttggaactc 540  
tggcgctctt accagcggag ttcatacctt ccctgccgta ttacagtcta gcgggccta 600  
ctccctctcc tctgtctgga cagtcccaag ctcttctctg ggaactcaaa cctacatctg 660  
caatgtgaac cataaaccta gcaacacgaa agtggacaaa aaggtcgaac ccaagagttg 720  
cgacaagaca cacacctgcc ctcttctgctc tgctccagag ctctcggcg gacctagcgt 780  
tttcttggtc cctccgaaac caaaggacac cttgatgatt tctcggacc ccgaggtgac 840  
atgtgtagta gttgatgtct cccacgagga ccctgaggtc aagtttaatt ggtatgtgga 900  
cgggtgtggag gtccacaacg ccaaaacaaa accacgggag gaacagtaca attccacata 960  
taggggtggtg agcgtcctta ccgtcctgca tcaggattgg ttaaattgta aggagtataa 1020  
gtgtaagggtg tctaacaagg ctctgcctgc tcccatcgaa aaaactataa gtaaggccaa 1080  
aggacagccc agggaacctc aggtgtatac tcttccacc agtagagatg agctgactaa 1140  
aaaccaggtg tccctgactt gtctggtgaa gggattttac ccatccgata tcgccgtgga 1200  
atgggagtcc aacggacagc cagaaaacaa ttataaaact atgccaccag tgctggatag 1260  
tgatggtagt tttttctgt acagtaagct gactgttgat aagagtagat ggacagcagg 1320  
taatgttttt agttgtagcg ttatgcacga agctctgcac aatcactata ctcagaagag 1380  
cctgagcctg agccccggtg agtgatgagg taccgagc 1418

<210> 30  
<211> 462  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1 chi

<220>  
<221> SEÑAL  
<222> (1)..(19)

ES 2 667 333 T3

<400> 30

Met Ala Val Leu Ala Leu Leu Leu Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys  
 1 5 10 15

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

Pro Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu  
 35 40 45

Ser Lys Phe Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu Trp Leu Gly Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser  
 65 70 75 80

Gly Leu Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln

ES 2 667 333 T3

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

ES 2 667 333 T3

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 340 345 350

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro  
 355 360 365

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val  
 370 375 380

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly  
 385 390 395 400

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Met Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp  
 405 410 415

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp  
 420 425 430

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His  
 435 440 445

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455 460

5 <210> 31  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR1de la cadena pesada del anticuerpo NPC-1 chi  
 <400> 31

Gly Phe Ser Leu Ser Lys Phe Gly Val Asn  
 1 5 10

15 <210> 32  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR2de la cadena pesada del anticuerpo NPC-1 chi  
 <400> 32

Val Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Ile Ser  
 1 5 10 15

25 <210> 33  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 30 <213> Secuencia artificial

ES 2 667 333 T3

<220>  
<223> CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo NPC-1 chi

<400> 33

5

Pro Gly Gly Asp Tyr  
1 5

<210> 34  
<211> 735  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Cadena ligera de NEO 103 humanizado

15

<400> 34

```

aagcttgcca ccatgaagta cctgctgccc accgctgctg ctggcttgct gctgctggca      60
gctcagcctg ccatggccga gatcgtgctg acccagtctc ctggcaccct gtctctgagc      120
cctggcgaga gagctaccct gtccctgctcc gcctcctcca gcatctccta catgtactgg      180
tatcagcaga agcccggcca ggcccctcgg ctgctgatct acgatacctc caagctggcc      240
tccggcatcc ccgacagatt ctccggetct ggctctggca ccgacttcac cctgaccatc      300
tcccggctgg aacccgagga cttcgcctgt tactactgcc accagcggga ctccctacccc      360
tggacctttg gccagggcac caagctggaa atcaagcggga ccgtggccgc tcctccgtg      420
ttcatcttcc caccttccga cgagcagctg aagtccggca ccgcttctgt cgtgtgctg      480
ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtgga aggtggacaa cgccctgcag      540
tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg      600
tcctctaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgcgaa      660
gtgaccacc accggcctgtc tagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgctga      720
tgaggatcct gatga                                             735

```

20

<210> 35  
<211> 239  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25

<220>  
<223> Cadena ligera de NEO 103 humanizado

<400> 35



ES 2 667 333 T3

Lys Leu Ala Thr Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln  
 20 25 30  
 Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
 35 40 45  
 Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys  
 50 55 60  
 Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe  
 85 90 95  
 Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr  
 100 105 110  
 Cys His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys  
 115 120 125  
 Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 130 135 140  
 Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu  
 145 150 155 160  
 Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp  
 165 170 175  
 Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp  
 180 185 190  
 Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys  
 195 200 205  
 Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln  
 210 215 220  
 Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 36  
 <211> 1437

ES 2 667 333 T3

<212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Cadena pesada de NEO 103 humanizado

<400> 36

```

aagccttgcca ccatggacct gctgtgcaag aacatgaagc acctgtgggt ctttctgctg      60
ctgggtggccg ctcccagatg ggtgctgtct caggtgcagc tgggtggaatc tggccctggc      120
ctgggtgcagc cttccagatc cctgtctctg acctgctcct ccagcggctt cagcctgtcc      180
aagttcggcg tgaactgggt gcgacagcct cctggcaagc gcctggaatg ggtgggagtg      240
atctggggcg acggctccac ctccataaac tccggcctga tctccagagt gaccatctcc      300
egggacacct ccaagaacca gctgttcctg aagatggact ccctgaccgc cgaggacacc      360
gocgtgtact actgtgctag acctggcggc gactactggg gccagggcac aacagtgacc      420
gtgtcctccg cttccaacaa gggcccctct gtgtttcctc tggccccctc cagcaagtcc      480
acctctgggtg gaactgccgc tctgggctgc ctctggaagg actacttccc cgagcccgtg      540
acagtgtcct ggaactctgg cgctctgacc tccggcgtgc acaccttcc agctgtgctg      600
cagtcacagcg gcctgtactc cctgtcctcc gtcgtgaccg tgccttccag ctctctgggc      660
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagccctcca ataccaaggt ggacaagaag      720
gtggaaccca agtcctgcga caagaccac acctgtcccc cttgtcctgc ccctgaactg      780
ctggggoggac cttccgtggt cctgttcccc ccaaagocca aggacacct gatgatctcc      840
cggacccccg aagtgaacct cgtggtgggt gatgtgtccc acgaggacc tgaagtgaag      900
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa      960
cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcatca ggactggctg     1020
aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgctgcccc catcgaaaag     1080
accatcagca aggctaaggg ccagccccgc gagccccagc tgtacacact gcctccatcc     1140
cgggaagaga tgaccaagaa tcaggtgtcc ctgacctgtc tcgtgaaagg cttctacccc     1200
tccgatatcg ccgtggaatg ggagtccaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc     1260
ccccctgtgc tggactccga cggtcattc ttctgtaca gcaagctgac agtggacaag     1320
tcccgggtggc agcagggcaa cgtgttctcc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac     1380
cactacaccc agaagtccct gtccctgagc cccggcaagt gatgatgagg atcctga      1437
    
```

10 <210> 37  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>

# ES 2 667 333 T3

<223> Cadena pesada de NEO 103 humanizado

<400> 37

Lys	Leu	Ala	Thr	Met	Asp	Leu	Leu	Cys	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Trp
1				5					10					15	

5

ES 2 667 333 T3

Phe Phe Leu Leu Leu Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val  
 20 25 30

Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Arg Ser Leu  
 35 40 45

Ser Leu Thr Cys Ser Ser Ser Gly Phe Ser Leu Ser Lys Phe Gly Val  
 50 55 60

Asn Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Val  
 65 70 75 80

Ile Trp Gly Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Ile Ser Arg  
 85 90 95

Val Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Leu Phe Leu Lys Met  
 100 105 110

Asp Ser Leu Thr Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro  
 115 120 125

Gly Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala  
 130 135 140

Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser  
 145 150 155 160

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe  
 165 170 175

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly  
 180 185 190

Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu  
 195 200 205

Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr  
 210 215 220

Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys  
 225 230 235 240

Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
 245 250 255

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
 260 265 270

ES 2 667 333 T3

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
 275 280 285

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
 290 295 300

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
 305 310 315 320

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
 325 330 335

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 340 345 350

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 355 360 365

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met  
 370 375 380

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 385 390 395 400

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 405 410 415

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 420 425 430

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 435 440 445

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 450 455 460

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 465 470

<210> 38  
 <211> 963  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo 16C3

<400> 38

5

10

ES 2 667 333 T3

```

goggggcagc ctcacacaga acacacacag atatgggtgt acccactcag ctctgttgc      60

tgtggcttac agtcgtagtt gtcagatgtg acatccagat gactcagtct ccagcttcac      120

tgtctgcate tgtgggagaa actgtcacca tcacatgtgg agcaagtgag aatatttacg      180

gtgctttaaa ttggtatcag cggaaacagg gaaaatctcc tcagctcctg atttatggcg      240

caagtaattt ggcagatggc atgtcatcga ggttcagtgg cagtggatct ggtagacagt      300

attctctcaa gatcagtagc ctgcatcctg acgatgttgc aacgtattac tgtcaaaatg      360

tattaagtag tccgtacacg ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa cgggctgatg      420

ctgcaccaac tgtatccate ttcccaccat ccagtgagca gttaacatct ggaggtgcct      480

cagtcgtgtg cttcttgaac aacttctacc ccaaagacat caatgtcaag tggagattg      540

atggcagtga acgacaaaat ggcgtcctga acagttggac tgatcaggac agcaaagaca      600

gcacctacag catgagcagc accctcacgt tgaccaagga cgagtatgaa cgacataaca      660

gctatacctg tgaggccact cacaagacac caacttcacc cattgtcaag agcttcaaca      720

ggaatgagtg ttagagacaa aggtcctgag acgccaccac cagctcccca gctccatcct      780

atcttccctt ctaaggtctt ggaggcttcc ccacaagcga ctaccactgt tgcggtgctc      840

caaacctcct ccccacctcc ttctcctcct cctcccttcc cttggctttt atcatgctaa      900

tatttgcaga aaatattcaa taaagtgatc tttgcacaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa      960

aaa                                                                 963

```

5 <210> 39  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Cadena ligera del anticuerpo 16C3

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (22)..(32)  
 <223> CDR1

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (48)..(54)  
 <223> CDR2

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (86)..(95)  
 <223> CDR3

<400> 39

ES 2 667 333 T3

Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr  
 1 5 10 15

Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn  
 20 25 30

Trp Tyr Gln Arg Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly  
 35 40 45

Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Met Ser Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Arg Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu His Pro Asp Asp  
 65 70 75 80

Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr Phe  
 85 90 95

Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Lys Gly  
 100 105

5 <210> 40  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de la cadena ligera de 16C3  
 <400> 40

Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn  
 1 5 10

15 <210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo 16C3  
 <400> 41

Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp  
 1 5

25 <210> 42  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo 16C3

# ES 2 667 333 T3

<400> 42

Cys	Gln	Asn	Val	Leu	Ser	Ser	Pro	Tyr	Thr
1				5					10

5 <210> 43  
<211> 1575  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cadena pesada del anticuerpo 16C3

<400> 43



ES 2 667 333 T3

acgcgggaca cagtagtctc tacagtcaca ggagtacaca ggacattgcc atgggttggg 60  
gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag gtccagctgc 120  
agcagtctgg gcctgagggtg gtgaggcctg gggctcagt gaagatttcc tgcaagggtt 180  
ccggctacac attcaactgat tatgctatgc actgggtgaa gcagagtcac gcaaagagtc 240  
tcgagtggat tggacttatt agtacttaca gtggtgatac aaagtacaac cagaatttaa 300  
gggcaaggcc acaatgactg tagacaaatc ctccaacaca gcctatatgg aacttgccag 360  
attgacatct gaggattctg ccatctatta ctgtgcaaga ggggattatt ccggtagtag 420  
gtactggttt gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgcag ccaaaacgac 480  
acccccatct gtctatccac tggcccctgg atctgctgcc caaactaact ccatggtgac 540  
cctgggatgc ctggtcaagg gctatttccc tgagccagtg acagtgacct ggaactctgg 600  
atccctgtcc agcgggtgtc acacottccc agctgttctc gcagctctgac ctctacactc 660  
tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc acctgcaacg 720  
ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtg acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggtt 780  
gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc cccccaaagc 840  
ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgttgtg gtagacatca 900  
gcaaggatga tcccagaggtc cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag gtgcacacag 960  
ctcagacgca accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc agtgaacttc 1020  
ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttcaa atgcagggtc aacagtgacg 1080  
ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaaccaa aggcagaccg aaggctccac 1140  
aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc agtctgacct 1200  
gcatgataac agactttctc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtgg aatgggcagc 1260  
cagcggagaa ctacaagaac actcagocca tcatggacac agatggctct tacttctctc 1320  
acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc acctgctctg 1380  
tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac tctcctggta 1440  
aatgatccca gtgtccttgg agccctctgg ccctacagga ctttgacacc tacctccacc 1500  
cctocctgta taaataaagc acccagcact gcctcgggac cctgcataaa aaaaaaaaaa 1560  
aaaaaaaaaa aaaaa 1575

<210> 44  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada del anticuerpo 16C3

5

ES 2 667 333 T3

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (23)..(32)  
 <223> CDR1

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (47)..(63)  
 <223> CDR2

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (96)..(107)  
 <223> CDR3

<400> 44

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

20 <210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo 16C3

<400> 45

Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr	Ala	Met	His
1				5					10

30 <210> 46

ES 2 667 333 T3

<211> 17  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo 16C3  
  
<400> 46

Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe Lys  
1 5 10 15

Gly

10  
  
15 <210> 47  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo 16C3  
  
20 <400> 47

Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

25 <210> 48  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> (ven16C3) de la cadena ligera del anticuerpo 16C3  
  
<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala  
20 25 30

35

ES 2 667 333 T3

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 49  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (cdr16C3) de la cadena ligera del anticuerpo 16C3

<400> 49

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gly Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Asp Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 50  
 <211> 107  
 <212> PRT

ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> (abb16C3) de la cadena ligera del anticuerpo 16C3

5

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala  
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Met Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Leu Ser Ser Pro Tyr  
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105

10

<210> 51

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> (sdr16C3) de la cadena ligera del anticuerpo 16C3

<400> 51

ES 2 667 333 T3

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

5 <210> 52  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> (fra16C3) de la cadena ligera del anticuerpo 16C3  
 <400> 52

ES 2 667 333 T3

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

<210> 53

<211> 121

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> (ven16C3) de la cadena pesada del anticuerpo 16C3

<400> 53

ES 2 667 333 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 54  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (cdr16C3) de la cadena pesada del anticuerpo 16C3

<400> 54



ES 2 667 333 T3

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val
1          5          10          15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20          25          30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35          40          45

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe
50          55          60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys
85          90          95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100          105          110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

- <210> 55
- <211> 121
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- <220>
- <223> (abb16C3) de la cadena pesada del anticuerpo 16C3
  
- <400> 55

ES 2 667 333 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 56  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (sdr16C3) de la cadena pesada del anticuerpo 16C3  
 <400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

ES 2 667 333 T3

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 57  
 <211> 121  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (fra16C3) de la cadena pesada del anticuerpo 16C3

<400> 57

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Arg Pro Gly Val  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Leu Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly  
 100 105 110

5

10

ES 2 667 333 T3

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115 120

5 <210> 58  
<211> 702  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cadena ligera de h16C3-Abb\*  
<400> 58

atgggcgtgc ccaccagct gctgctgctg tggctgaccg tgggtggtggt gcggtgcgac 60  
atccagatga cccagtcccc tagctctctg agcgcctccg tgggogacag ggtgaccatc 120  
acctgccaaag cctctgagaa catctacggc gccctgaact ggtaccagag gaagcccggc 180  
aagagcccca agctgctgat ctacggcgcc tctaacctgg ccaccggcat gcctagccgg 240  
ttctccggct ccggcagcgg caccgactac accttcacca tctctcct gcaaccogag 300  
gacatcgcca cctactactg ccagcaggtg ctgtcctccc cctacacctt cggcgggcggc 360  
accaaactgg agatcaagcg gaccgtggcc gccccagcg tgttcatctt cccccctct 420  
gacgagcagc tgaagtccgg caccgcctct gtggtgtgcc tgetgaacaa cttctacccc 480  
agggaggcca aggtccagtg gaaggtggac aacgccttgc agtccggcaa cagccaggag 540  
tctgtgaccg agcaggactc caaggactcc acctacagcc tgtctagcac cctgaccctg 600  
tccaaggccg actacgagaa gcacaagggtg tacgcctgcg aggtgaccca ccagggcctg 660  
tccagccctg tgaccaagtc cttcaacagg ggcgagtgct ga 702

15 <210> 59  
<211> 233  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cadena ligera de h16C3-Abb\*

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (43)..(53)  
<223> CDR1

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (69)..(75)  
<223> CDR2

35 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (108)..(116)  
<223> CDR3  
<400> 59

ES 2 667 333 T3

Met Gly Val Pro Thr Gln Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr Val Val Val  
 1 5 10 15

Val Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala  
 20 25 30

Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Asn Ile  
 35 40 45

Tyr Gly Ala Leu Asn Trp Tyr Gln Arg Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys  
 50 55 60

Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Met Pro Ser Arg  
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser  
 85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Leu Ser  
 100 105 110

Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr  
 115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu  
 130 135 140

Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro  
 145 150 155 160

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly  
 165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr  
 180 185 190

Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His  
 195 200 205

Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val  
 210 215 220

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230

<210> 60  
 <211> 11

ES 2 667 333 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> CDR1 de la cadena ligera de h16C3-Abb\*

<400> 60

**Gln Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Gly Ala Leu Asn**  
**1 5 10**

10 <210> 61  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> CDR2 de la cadena ligera de h16C3-Abb\*

20 <400> 61

**Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr**  
**1 5**

25 <210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> CDR3 de la cadena ligera de h16C3-Abb\*

<400> 62

**Gln Gln Val Leu Ser Ser Pro Tyr Thr**  
**1 5**

35 <210> 63  
<211> 1413  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

40 <220>  
<223> Cadena pesada de h16C3-Abb\*

<400> 63

ES 2 667 333 T3

atgggctggt cctgcatcat cttcttcctg gtggccaccg ccaccggcgt gcacagccag 60  
gtgcagcttg tgcagagcgg cgccgaggtg aagaagcccc gcgccagcgt gaaggtgtcc 120  
tgcaaggcct ccggctacac cttcacccgac tacgccatgc actgggtgcg gcaggccccc 180  
ggccagcggc tggagtggat gggcctgatc agcacctact ctggcgacac caagtacaac 240  
cagaacttcc agggccgggt gaccatgacc gtggacaaga gcgccagcac cgcctacatg 300  
gagctgtcct ccctgaggtc tgaggacacc gccgtgtact actgcgcccc gggcgactac 360  
agcggcagcc ggtactgggt cgcctactgg ggccagggca ccctggtgac cgtgtccagc 420  
  
gcctctacca agggccccag cgtgtttccc ctggcccctt cctccaaaag caccagcggc 480  
ggtaaccgcg ccctgggctg cctggtgaag gactacttcc ccgagcccgt gaccgtgagc 540  
tggaactccg gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcaaagctcc 600  
ggcctgtact ccctgagctc tgtggtgacc gtgccctcca gctccctggg caccagacc 660  
tacatctgca acgtgaacca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 720  
aagtcttgcg acaagacca cacctgcccc ccttgccctg ccctgagct gctgggcggc 780  
cccagcgtgt tcctgttccc tcccgaagccc aaggacacc tgatgatctc ccggaccct 840  
gaggtgacct gcgtgggtgt ggatgtgagc cacgaggatc ctgaagtga gttcaattgg 900  
tatgtggatg gcgtggaggt gcacaacgcc aagaccaagc cccgggagga gcagtacaac 960  
agcacctaca gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaag 1020  
gagtacaagt gcaaggtgtc caacaaggcc ctgcccgcc ccacgagaa gaccatctcc 1080  
aaggccaagg gccagccccg ggagccccag gtgtacacc tcctcccag ccgggacgag 1140  
ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgc ctggtgaagg gcttctacc ctctgacatc 1200  
gccgtggagt gggagagcaa cggccagccc gagaacaact acaagaccac ccccccggtg 1260  
ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tctaagctga ccgtggacaa gtcccgtggt 1320  
cagcagggca acgtgttcag ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1380  
cagaagagcc tgagcctgtc tcccggcaag tga 1413

<210> 64  
<211> 470  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
10 <223> Cadena pesada de h16C3-Abb\*

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (45)..(54)  
<223> CDR1

ES 2 667 333 T3

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (70)..(85)  
<223> CDR2

5

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (118)..(129)  
<223> CDR3

10

<400> 64

**Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly**



ES 2 667 333 T3

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

ES 2 667 333 T3

			260						265						270
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
		275					280					285			
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
	290					295					300				
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn
305					310					315					320
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp
				325					330					335	
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro
			340					345					350		
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
		355					360					365			
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn
	370					375					380				
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
385					390					395					400
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
				405					410					415	
Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
			420					425					430		
Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys
	435						440					445			
Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu
	450					455					460				
Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										
465					470										

<210> 65  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> CDR1 de la cadena pesada de h16C3-Abb\*

ES 2 667 333 T3

<400> 65

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met His  
1 5 10

5 <210> 66  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> CDR2 de la cadena pesada de h16C3-Abb\*

<400> 66

Ile Ser Thr Tyr Ser Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gln Asn Phe Gln Gly  
1 5 10 15

15 <210> 67  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> CDR3 de la cadena pesada de h16C3-Abb\*

25 <400> 67

Gly Asp Tyr Ser Gly Ser Arg Tyr Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

30 <210> 68  
<211> 236  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> Cadena ligera del anticuerpo 31.1

<400> 68

Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu Leu Leu Ala  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser  
20 25 30

Leu Pro Val Ser Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ala Ser  
35 40 45

Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln  
50 55 60

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val  
65 70 75 80

40

ES 2 667 333 T3

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys  
 85 90 95

Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110

Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp  
 130 135 140

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn  
 145 150 155 160

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu  
 165 170 175

Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr  
 195 200 205

Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser  
 210 215 220

Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235

<210> 69

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Cadena pesada del anticuerpo 31.1 humanizado

<400> 69

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 35 40 45

ES 2 667 333 T3

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 50 55 60

Glu 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 Ser Met Ser Leu Asp Thr Ser Thr Ser  
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 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 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser  
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala  
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val  
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala  
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val  
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His  
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys  
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 290 295 300

ES 2 667 333 T3

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 450 455 460

Pro Gly Lys  
 465

<210> 70  
 <211> 738  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de NEO 302 humanizado

10

<400> 70

ES 2 667 333 T3

```

aagcttgcca ccatgaagta cctgctgccc accgctgctg ctggcttgct gctgctggca      60
gctcagcctg ccatggcoga gatcgtgatg acccagtccc ctctgtccct gcctgtgtct      120
cctggcgagc ctgcctccat ctctgcaag gcctcccagt ccgtgtccaa cgacgtggcc      180
tggtatctgc agaagcctgg ccagtcccc aagctgctga tctactacgc ctccaaccgg      240
tacaccggcg tgcccagacag attctcggc tctggctctg gcaccgactt caccctgaag      300

atctcccggg tggaagcoga ggacctgggc gtgtactact gtcagcagga ctactcctcc      360
cccctgacct ttggccaggg caccaagctg gaaatcaagc ggaccgtggc cgctccctcc      420
gtgttcacct tcccaccttc cgacgagcag ctgaagtccg gcaccgcttc tgtcgtgtgc      480
ctgctgaaca acttctacc cgcgaggcc aaggtgcagt ggaaggtgga caacgccctg      540
cagtccggca actcccagga atccgtgacc gagcaggact ccaaggacag cacctactcc      600
ctgtccagca ccctgacct gtccaaggcc gactacgaga agcacaaggt gtacgcctgc      660
gaagtgacc accagggcct gtctagcccc gtgaccaagt ctttcaaccg gggcgagtgc      720
tgatgatgag gatcctga                                     738

```

<210> 71  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Cadena ligera de NEO 302 humanizado

10

<400> 71

ES 2 667 333 T3

Lys Leu Ala Thr Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu  
 1 5 10 15  
 Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Ile Val Met Thr Gln  
 20 25 30  
 Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser  
 35 40 45  
 Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Leu Gln  
 50 55 60  
 Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg  
 65 70 75 80  
 Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp  
 85 90 95  
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr  
 100 105 110  
 Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr  
 115 120 125  
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175  
 Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln  
 180 185 190  
 Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser  
 195 200 205  
 Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His  
 210 215 220  
 Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 72  
 <211> 1431  
 <212> ADN



ES 2 667 333 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada de NEO 302 humanizado

5

<400> 72

```

aagcttgcca ccatggactg gacctggcgc atcctgtttc tgggtggccgc tgctacagge      60
gccaggctc aggtgcagct ggtgcagtct ggacccgagc tgaagaaacc tggcgcctcc      120
gtgaagggtg cctgcaaggc ttccggctac acctttacca actacggcat gaactgggtg      180
cgacaggccc ctggcaaggg cctggaatgg atgggctgga tcaacaccta caccggcgag      240
cccacctacg cggacgactt caagggccgg ttctccatgt ccctggacac ctccaccagc      300
accgcctacc tgcagatctc cagcctgaag tccgaggata ccgccgtgta cttctgcgcc      360
agagcctact acggcaagta cttcgactac tggggccagg gcaccctcgt gaccgtgtcc      420
tctgcttcta ccaagggccc ctccgtgttc cctctggccc cttccagcaa gtctacctct      480
ggcggcacag ccgctctggg ctgcctcgtg aaggactact tccccgagcc cgtgacagtg      540
tcttgaact ctggcgcctt gacctccggc gtgcacacct ttccagctgt gctgcagtcc      600
tccggcctgt actccctgtc ctccgtcgtg actgtgcctt ccagctctct gggcaccag      660
acctacatct gcaacgtgaa ccacaagccc tccaacacca aggtggacaa gaaggtggaa      720
cccaagtctt gcgacaagac ccacacctgt ccccttgtc ctgcccctga actgctgggc      780
ggaccagcg tgttctctgt cccccaaag cccaaggaca cctgatgat ctcccggacc      840
cccgaagtga cctgcgtggt ggtggatgtg tctcacgagg accctgaagt gaagttcaat      900

tggtacgtgg acggcgtgga agtgcacaac gccaaagacca agcctagaga ggaacagtac      960
aactccacct accgggtggt gtccgtcgtg accgtgctgc accaggattg gctgaacggc     1020
aaagagtaca agtgcaaggt gtccaacaag gcctgcctg ccccatcga aaagaccatc     1080
tccaaggcca agggccagcc ccgggaacc caggtgtaca cactgcccc tagcagggac     1140
gagctgacca agaaccaggt gtccctgacc tgtctcgtga aaggcttcta cccctccgat     1200
atcgccgtgg aatgggagtc caacggccag cctgagaaca actacaagac cccccccct     1260
gtgctggact ccgacggctc attcttctg tacagcaagc tgacagtgga caagtcccgg     1320
tggcagcagg gcaacgtgtt ctccctgctc gtgatgcacg aggccctgca caaccactac     1380
accagaagt ccctgtccct gagccccggc aagtgatgat gaggatcctg a              1431

```

10

<210> 73

<211> 471

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 667 333 T3

<220>

<223> Cadena pesada de NEO 302 humanizado

<400> 73

5

Lys Leu Ala Thr Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala  
 1 5 10 15

Ala Ala Thr Gly Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro  
 20 25 30

Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser  
 35 40 45

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro  
 50 55 60

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu  
 65 70 75 80

Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Ser Met Ser Leu Asp  
 85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ser Glu  
 100 105 110

Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe  
 115 120 125

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr





ES 2 667 333 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45

ES 2 667 333 T3

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Thr Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val

ES 2 667 333 T3

290		295		300																
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr					
305					310					315					320					
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr					
				325					330					335						
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu					
			340					345					350							
Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys					
		355					360					365								
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser					
	370					375					380									
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Met	Pro	Pro	Val	Leu	Asp					
385					390					395					400					
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser					
				405					410					415						
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala					
			420					425					430							
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					
		435					440					445								

- 5 <210> 75
- <211> 448
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> (abb31.1) de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303
  
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(118)
- <223> Región variable
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (25)..(35)
- <223> CDR1
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(70)
- <223> CDR2
  
- 25

ES 2 667 333 T3

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (99)..(108)  
 <223> CDR3

5

<400> 75

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
 165 170 175

Ser Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
 180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
 195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
 210 215 220



ES 2 667 333 T3

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
 225 230 235 240  
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
 245 250 255  
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
 260 265 270  
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
 275 280 285  
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 290 295 300  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
 305 310 315 320  
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
 325 330 335  
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
 340 345 350  
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365  
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380  
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Met Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400  
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415  
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430  
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

<210> 76  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>

5

## ES 2 667 333 T3

<223> (sdr31.1) de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (1)..(118)

<223> Región variable

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (25)..(35)

<223> CDR1

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (50)..(70)

<223> CDR2

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20 <222> (99)..(108)

<223> CDR3

<400> 76

ES 2 667 333 T3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe  
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
 130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
 145 150 155 160

ES 2 667 333 T3

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Met Pro Pro Val Leu Asp  
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
405 410 415

ES 2 667 333 T3

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

- 5 <210> 77
- <211> 448
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
  
- 10 <220>
- <223> (ven31.1) de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303
  
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(118)
- <223> Región variable
  
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (25)..(35)
- <223> CDR1
  
- 25 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (50)..(70)
- <223> CDR2
  
- 30 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (99)..(108)
- <223> CDR3
  
- <400> 77

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Thr Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

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

ES 2 667 333 T3

Ala Arg Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly  
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn  
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln  
165 170 175

Ser Ser Gly Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser  
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser  
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr  
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser  
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg  
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro  
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala  
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr  
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr  
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu  
340 345 350

ES 2 667 333 T3

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys  
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser  
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Met Pro Pro Val Leu Asp  
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser  
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala  
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

5 <210> 78  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR1 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303  
 <400> 78

Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly Met Asn  
 1 5 10

15 <210> 79  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303  
 <400> 79

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

25 Gly Arg Phe Ala Phe  
 20

30 <210> 80  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303

ES 2 667 333 T3

<400> 80

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Phe  
 20

5 <210> 81  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303

<400> 81

Trp Ile Asn Pro Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly Arg Val Thr Phe  
 20

15 <210> 82  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> CDR2 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303

25 <400> 82

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly Arg Phe Ala Phe  
 20

30 <210> 83  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> CDR3 de la cadena pesada del anticuerpo NEO-303

<400> 83

Ala Tyr Tyr Gly Lys Tyr Phe Asp Tyr Trp  
 1 5 10

40 <210> 84  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



# ES 2 667 333 T3

<220>  
<223> (cdr31.1) de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(107)  
<223> Región variable

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (21)..(34)  
<223> CDR1

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (50)..(56)  
<223> CDR2

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR3

25 <400> 84

ES 2 667 333 T3

Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 85  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 667 333 T3

<220>  
 <223> (abb31.1) de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Región variable

10 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(34)  
 <223> CDR1

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(56)  
 <223> CDR2

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR3

25 <400> 85

Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110  
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125  
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140  
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160  
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175  
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190  
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205  
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

- 5 <210> 86
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> (sdr31.1) de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303
- <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (1)..(107)
- <223> Región variable
- 15 <220>
- <221> MISC\_FEATURE
- <222> (21)..(34)
- <223> CDR1
- 20 <220>
- <221> MISC\_FEATURE

ES 2 667 333 T3

<222> (50)..(56)  
<223> CDR2

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (89)..(97)  
<223> CDR3

10 <400> 86

ES 2 667 333 T3

Ser Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asp  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

<210> 87  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> (ven31.1) de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

5

10

ES 2 667 333 T3

5  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(107)  
 <223> Región variable

10  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (21)..(34)  
 <223> CDR1

15  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (50)..(56)  
 <223> CDR2

20  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (89)..(97)  
 <223> CDR3

<400> 87

Ser Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu  
 85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 100 105 110

ES 2 667 333 T3

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 210

- <210> 88
- <211> 14
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303
- <400> 88

Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala  
 1 5 10

- 15 <210> 89
- <211> 14
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 20 <220>
- <223> CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303
- <400> 89

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala  
 1 5 10

- 25 <210> 90
- <211> 14
- <212> PRT
- 30 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> CDR1 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303



ES 2 667 333 T3

<400> 90

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Asp Leu Ala  
1 5 10

5 <210> 91  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

<400> 91

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr  
1 5

15  
20 <210> 92  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> CDR2 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

25 <400> 92

Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Ser  
1 5

30 <210> 93  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

35 <220>  
<223> CDR3 de la cadena ligera del anticuerpo NEO-303

<400> 93

Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Leu Thr  
1 5

40 <210> 94  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45 <220>  
<223> Epítipo 31.1

50 <400> 94

Ser Pro Thr Pro Gln Tyr Ser Trp Lys Arg Tyr Asn Ile Leu Asn Gln

ES 2 667 333 T3

1

5

10

15

Glu Gln Pro

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a un antígeno A33, o un fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende:

- 5 una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:77 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:87;
- b) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:77 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:87;
- 10 c) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:77 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:87;
- d) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:74 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:84;
- e) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:75 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:85;
- 15 f) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:76 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de SEQ ID NO:86;
- g) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:74 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:84;
- h) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:74 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:85;
- 20 i) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:74 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:86;
- j) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:74 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:87;
- k) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:75 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:84;
- 25 l) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:75 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:85;
- m) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:75 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:86;
- 30 n) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:75 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:87;
- o) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:76 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:84;
- p) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:76 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:85;
- 35 q) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:76 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:86;
- r) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:76 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:87;
- 40 s) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:77 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:84;
- t) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:77 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:85;
- u) una cadena pesada que comprende la cadena variable de aminoácidos 1 a 118 de SEQ ID NO:77 y una cadena ligera que comprende la cadena ligera variable de aminoácidos 1 a 107 de SEQ ID NO:86;
- 45 v) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:74 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:84;
- w) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:74 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:85;
- x) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:74 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:86;
- y) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:74 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:87;
- 50 z) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:75 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:84;
- aa) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:75 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:85;
- bb) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:75 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:86;
- cc) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:75 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:87;
- dd) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:76 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:84;
- 55 ee) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:76 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:85;
- ff) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:76 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:86;
- gg) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:76 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:87;
- hh) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:77 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:84;
- ii) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:77 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:85;
- 60 o jj) un polipéptido de la cadena pesada de SEQ ID NO:77 y un polipéptido de la cadena ligera de SEQ ID NO:86.

2. El anticuerpo o fragmento del mismo aislado de la reivindicación 1, que comprende al menos una cadena pesada o región variable de cadena pesada y al menos una cadena ligera o región variable de cadena ligera.

3. El anticuerpo o fragmento del mismo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se une

específicamente a la secuencia de aminoácidos de una o más de las SEQ ID NOS:10, 11, 12, o 13.

4. El anticuerpo o fragmento del mismo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que tiene actividad antitumoral, es un anticuerpo de la IgG1 humana o un anticuerpo de la IgG3 humana, o es un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, CDR, parátipo, o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno, se conjuga de forma directa o indirecta con una marca, un agente citotóxico, un agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, y/o dicho anticuerpo potencia ADCC o CDC.
5. El anticuerpo o fragmento del mismo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que se mezcla en una composición con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, un agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, se administra en combinación con un anticuerpo, marca, un agente citotóxico, un agente terapéutico, o un agente inmunosupresor, de forma simultánea o secuencial, donde dicha marca es opcionalmente una marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, o una marca radioactiva, donde dicha marca paramagnética es opcionalmente aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio, donde el agente citotóxico es opcionalmente un resto que inhibe el ADN, el ARN, o la síntesis de proteínas, un radionucleido, una proteína de unión al ribosoma, <sup>212</sup>Bi, <sup>131</sup>I, <sup>188</sup>Re, <sup>90</sup>Y, vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antivírica pokeweed, exotoxina A de Pseudomonas, ricina, toxina de la difteria, cadena de ricina A, o enzima fosfolipasa citotóxica, donde opcionalmente dicho agente terapéutico es linfoquina o factor de crecimiento, y/o donde opcionalmente dicho agente inmunosupresor es ciclosporina, leflunomida, metotrexato, azatioprina, mercaptopurina, dactinomicina, tacrolimus, o sirolimus.
6. Una composición que comprende un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores reivindicaciones, que comprende opcionalmente un transportador farmacéuticamente aceptable.
7. Un anticuerpo o fragmento del mismo de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de la reivindicación 6 para su uso en la prevención o el tratamiento del cáncer en un paciente, opcionalmente para su uso en combinación simultánea o secuencialmente con otro anticuerpo, una linfoquina, o un factor de crecimiento hematopoyético, donde opcionalmente, dicho anticuerpo retrasa el crecimiento o la replicación de las células cancerosas en el paciente, destruye las células cancerosas en el paciente, y/o promueve la regresión del tumor en el paciente, donde opcionalmente, dicho cáncer es cáncer de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado, donde opcionalmente, dicho cáncer está en el estadio 1, 2, 3 o 4, donde opcionalmente, dicho cáncer ha metastatizado, donde opcionalmente, dicho paciente expresa niveles detectables de un epítipo 31.1, donde opcionalmente, dicho paciente está en riesgo de tener cáncer u opcionalmente no tiene síntomas.
8. El anticuerpo o fragmento del mismo o una composición para su uso de la reivindicación 7, donde el epítipo 31.1 se ha detectado en el paciente en una muestra de tumor, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, fluido amniótico, exudado inflamatorio, sangre, suero, heces, o líquido recogido del tracto colorrectal, determinando por tanto que dicho tumor contiene células que se unen a dicho anticuerpo.
9. Un método *in vitro* para detectar un epítipo 31.1, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra de ensayo con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición de la reivindicación 6, que se une a un epítipo 31.1, donde dicho anticuerpo o fragmento se conjuga opcionalmente con una marca, marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, una marca radioactiva, donde opcionalmente dicha marca paramagnética es aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio y
- (b) detectar complejos de epítipo-anticuerpo,
- donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma, opcionalmente de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado, donde opcionalmente, dichas muestras de ensayo se obtienen de un paciente en riesgo de cáncer y/o sin síntomas.
10. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una composición de la reivindicación 6 que se une a un epítipo 31.1 para su uso en un método para detectar un epítipo 31.1 *in vivo*, donde la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma, opcionalmente de pulmón, de mama, de páncreas, de útero, de esófago, colorrectal, o cáncer de hígado, comprendiendo el método:
- (a) administrar a un paciente un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 o una composición de la reivindicación 6, donde dicho anticuerpo o fragmento se conjuga opcionalmente con una marca, marca quimioluminiscente, una marca paramagnética, un agente de contraste de IRM, una marca fluorescente, una marca bioluminiscente, una marca radioactiva, donde opcionalmente dicha marca paramagnética es aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio y
- (b) detectar complejos de epítipo-anticuerpo.

11. El método de la reivindicación 9 o el anticuerpo o el fragmento para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la composición para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10, donde dicho método detecta pólipos colorrectales, tumores benignos, tumores malignos, tumores metastásicos, tumores no metastásicos, y/o células precancerosas.
- 5
12. El método de la reivindicación 9 o la reivindicación 11 o el anticuerpo o fragmento de anticuerpos para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, o la composición para su uso en un método de acuerdo con la reivindicación 10 o la reivindicación 11, donde el complejo de epítipo-anticuerpo se detecta *in vitro* mediante un ensayo seleccionado entre el grupo que consiste en transferencia Western, radioinmunoensayos, ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción), inmunoensayos de tipo "sándwich", un ensayo de flujo lateral, ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación mediante difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunohistoquímicos, inmunoensayos fluorescentes, e inmunoensayos de proteína A, o se detecta *in vivo* mediante que comprende tomografía de emisión de positrones (PET), sistema de vigilancia CCD con poca luz, rayos x, exploración por TAC, gammagrafía, formación de imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), formación de imágenes por resonancia magnética (IRM), ultrasonidos, formación de imágenes paramagnéticas, y tomografía endoscópica de coherencia óptica.
- 10
- 15
13. Un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde opcionalmente dicho ácido nucleico está contenido en un vector o célula hospedadora.
- 20
14. Un método de preparar el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende expresar un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 13 en una célula o un sistema de traducción exento de células, y opcionalmente, purificar dicho anticuerpo.
- 25

FIGURA 1A  
cdr31.1-HC

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKGLKMWGINTYTGEPYADDFKGRFAFTLD  
TSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCARAYYGKFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGYPYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTMPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

FIGURA 1B  
abb31.1-HC

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWGWINTYTGEPYQKFGQGRVTFLLD  
TSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCARAYYGKFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGYPYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTMPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

FIGURA 1C  
sdr31.1-HC

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKKASGYTFTNYGMNWVRQAPGKGLEWGWINPYTGEPYQKFGQGRVTFLLD  
TSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCARAYYGKFDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
ALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGYPYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICN  
VNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCV  
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV  
SNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN  
GQPENNYKTMPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP  
GK

FIGURA 1C  
ven31.1-HC

QIQLVQSGPEVKKPGASVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGQGLKMWGINTYTGEPYADDFKGRFAFT  
LDSISTAYLEISRLRSDDTAVYFCARAYYGKFDYWGQGTITLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTA  
LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGYPYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD  
KKEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTMPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSC  
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

FIGURA 1E

posición de alineamiento		1.....	11.....	21.....	31.....	41.....
cdr31.1-HC	1	QIQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKKASGYTFT	NYGMNWRVQA	PGKGLKWMGW
abb31.1-HC	1	QIQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKKASGYTFT	NYGMNWRVQA	PGKGLKWMGW
sdr31.1-HC	1	QIQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SKKASGYTFT	NYGMNWRVQA	PGKGLKWMGW
ven31.1-HC	1	QIQLVQSGPE	VKKPGASVKI	SKKASGYTFT	NYGMNWRVQA	PGQGLKWMGW
				CDR1		
posición de alineamiento		51.....	61.....	71.....	81.....	91.....
cdr31.1-HC	51	<u>INTYTGEPTY</u>	<u>ADDFKGRFAF</u>	TLDTISISTAY	NELSRLSDD	TAVYFCARAY
abb31.1-HC	51	<u>INTYTGEPTY</u>	<u>AQKFGGRVTF</u>	TLDTISISTAY	NELSRLSDD	TAVYFCARAY
sdr31.1-HC	51	<u>INPYTGEPTY</u>	<u>AQKFGGRVTF</u>	TLDTISISTAY	NELSRLSDD	TAVYFCARAY
ven31.1-HC	51	<u>INTYTGEPTY</u>	<u>ADDFKGRFAF</u>	TLDTISISTAY	LEISRLSDD	TAVYFCARAY
				CDR2		
posición de alineamiento		101.....	111.....	121.....	131.....	141.....
cdr31.1-HC	101	<u>YGKYFDYWGQ</u>	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY
abb31.1-HC	101	<u>YGKYFDYWGQ</u>	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY
sdr31.1-HC	101	<u>YGKYFDYWGQ</u>	GTTVTVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY
ven31.1-HC	101	<u>YGKYFDYWGQ</u>	GTTTLVSSAS	TKGPSVFPLA	PSSKSTSGGT	AALGCLVKDY
				CDR3		
posición de alineamiento		151.....	161.....	171.....	181.....	191.....
cdr31.1-HC	151	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGP	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI
abb31.1-HC	151	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGP	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI
sdr31.1-HC	151	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGP	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI
ven31.1-HC	151	FPEPVTVSWN	SGALTSGVHT	FPAVLQSSGP	YSLSSVVTVP	SSSLGTQTYI
posición de alineamiento		201.....	211.....	221.....	231.....	241.....
cdr31.1-HC	201	CNVNHHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPCC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD
abb31.1-HC	201	CNVNHHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPCC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD
sdr31.1-HC	201	CNVNHHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPCC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD
ven31.1-HC	201	CNVNHHKPSNT	KVDKKVEPKS	CDKTHTCPCC	PAPELLGGPS	VFLFPPKPKD
posición de alineamiento		251.....	261.....	271.....	281.....	291.....
cdr31.1-HC	251	TLMISRTPPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST
abb31.1-HC	251	TLMISRTPPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST
sdr31.1-HC	251	TLMISRTPPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST
ven31.1-HC	251	TLMISRTPPEV	TCVVVDVSHE	DPEVKFNWYV	DGVEVHNAKT	KPREEQYNST
posición de alineamiento		301.....	311.....	321.....	331.....	341.....
cdr31.1-HC	301	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY
abb31.1-HC	301	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY
sdr31.1-HC	301	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY
ven31.1-HC	301	YRVVSVLTVL	HQDWLNGKEY	KCKVSNKALP	APIEKTISKA	KGQPREPQVY
posición de alineamiento		351.....	361.....	371.....	381.....	391.....
cdr31.1-HC	351	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTMPPVLD
abb31.1-HC	351	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTMPPVLD
sdr31.1-HC	351	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTMPPVLD
ven31.1-HC	351	TLPPSRDELT	KNQVSLTCLV	KGFYPSDIAV	EWESNGQPEN	NYKTMPPVLD
posición de alineamiento		401.....	411.....	421.....	431.....	441.....
cdr31.1-HC	401	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK
abb31.1-HC	401	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK
sdr31.1-HC	401	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK
ven31.1-HC	401	SDGSFFLYSK	LTVDKSRWQQ	GNVFSCVMH	EALHNHYTQK	SLSLSPGK

FIGURA 2A  
cdr31.1-LC

SIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFLTISS  
LQPEDFAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGE C

FIGURA 2B  
abb31.1-LC

SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSNDAVWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYSGVDRFSGSGYGTDFLTISS  
LQPEDFAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGE C

FIGURA 2C  
sdr31.1-LC

SIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQSVSNDAVWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDFLTISS  
LQPEDFAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV  
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGE C

FIGURA 2D  
ven31.1-LC

SIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQSVSNDAVWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFSGSGYGTDF  
TFTISSVQPEDLAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR  
EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN  
RGE C



FIGURA 2E

posición de alineamiento		1.....	11.....	21.....	31.....	41.....
cdr31.1-LC	1	SIVMTQSPSS	LSASVGRVT	<u>ITCKASQSVS</u>	<u>NDVAWYQQKP</u>	<u>GQSPKLLIYY</u>
abb31.1-LC	1	SIQMTQSPSS	LSASVGRVT	<u>ITCRASQSVS</u>	<u>NDVAWYQQKP</u>	<u>GQSPKLLIYY</u>
sdr31.1-LC	1	SIQMTQSPSS	LSASVGRVT	<u>ITCRASQSVS</u>	<u>NDLAWYQQKP</u>	<u>GQSPKLLIYY</u>
ven31.1-LC	1	SIVMTQSPSS	LSVSVGRVT	<u>ITCKASQSVS</u>	<u>NDVAWYQQKP</u>	<u>GQSPKLLIYY</u>
				<u>CDR1</u>		
posición de alineamiento		51.....	61.....	71.....	81.....	91.....
cdr31.1-LC	51	<u>ASNRYTGVPD</u>	<u>RFGSGYGTD</u>	<u>FTLTISLQF</u>	<u>EDFAVYFCQQ</u>	<u>DYSSPLTFGA</u>
abb31.1-LC	51	<u>ASNRYSGVPD</u>	<u>RFGSGYGTD</u>	<u>FTLTISLQF</u>	<u>EDFAVYFCQQ</u>	<u>DYSSPLTFGA</u>
sdr31.1-LC	51	<u>ASNRYTGVPD</u>	<u>RFGSGYGTD</u>	<u>FTLTISLQF</u>	<u>EDFAVYFCQQ</u>	<u>DYSSPLTFGA</u>
ven31.1-LC	51	<u>ASNRYTGVPD</u>	<u>RFGSGYGTD</u>	<u>FTFTISSVQF</u>	<u>EDLAVYFCQQ</u>	<u>DYSSPLTFGA</u>
		<u>CDR2</u>		<u>CDR3</u>		
posición de alineamiento		101.....	111.....	121.....	131.....	141.....
cdr31.1-LC	101	GTKLEIKRTV	AAPSVFIPPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV
abb31.1-LC	101	GTKLEIKRTV	AAPSVFIPPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV
sdr31.1-LC	101	GTKLEIKRTV	AAPSVFIPPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV
ven31.1-LC	101	GTKLEIKRTV	AAPSVFIPPP	SDEQLKSGTA	SVVCLLNNEY	PREAKVQWKV
posición de alineamiento		151.....	161.....	171.....	181.....	191.....
cdr31.1-LC	151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
abb31.1-LC	151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
sdr31.1-LC	151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
ven31.1-LC	151	DNALQSGNSQ	ESVTEQDSKD	STYLSSTLT	LSKADYEKHK	VYACEVTHQG
posición de alineamiento		201.....	211.....			
cdr31.1-LC	201	LSSPVTKSFN	RGEC			
abb31.1-LC	201	LSSPVTKSFN	RGEC			
sdr31.1-LC	201	LSSPVTKSFN	RGEC			
ven31.1-LC	201	LSSPVTKSFN	RGEC			

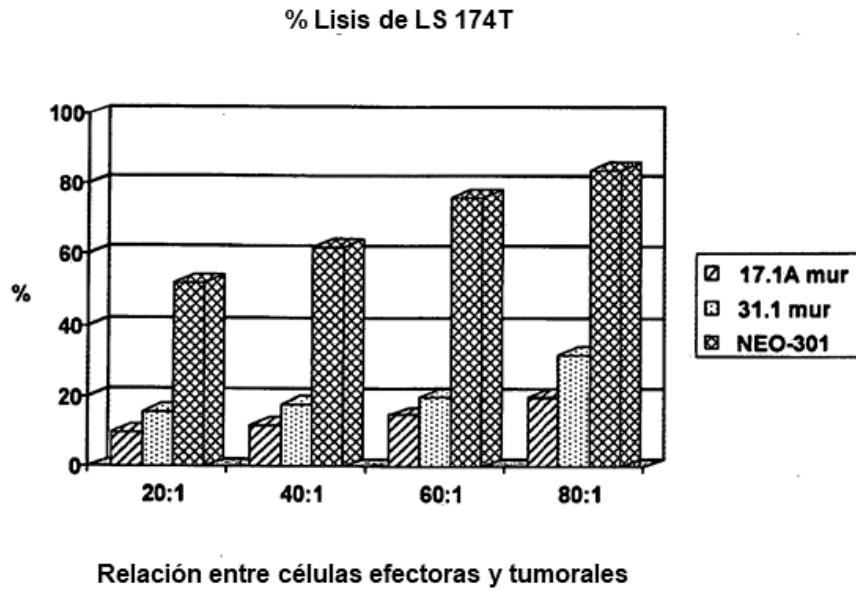


FIGURA 3

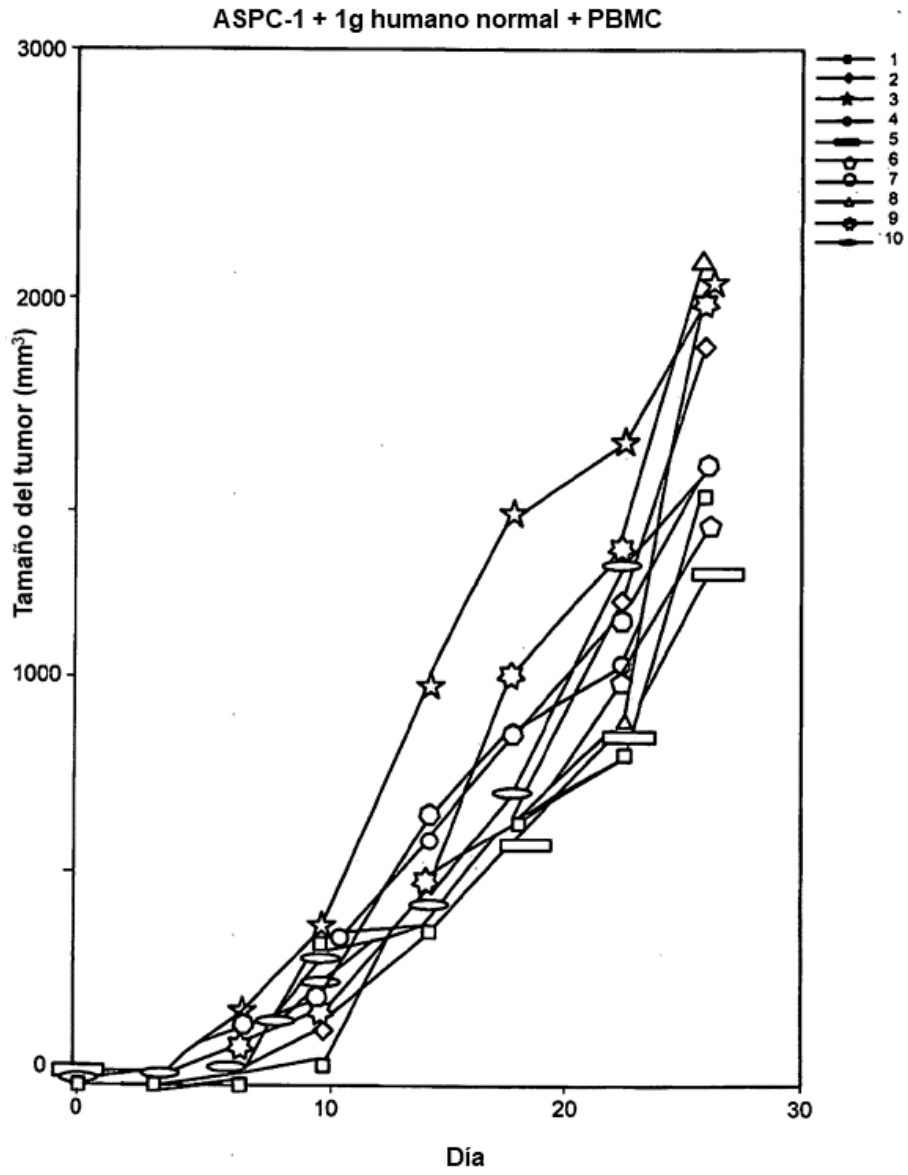


FIGURA 4

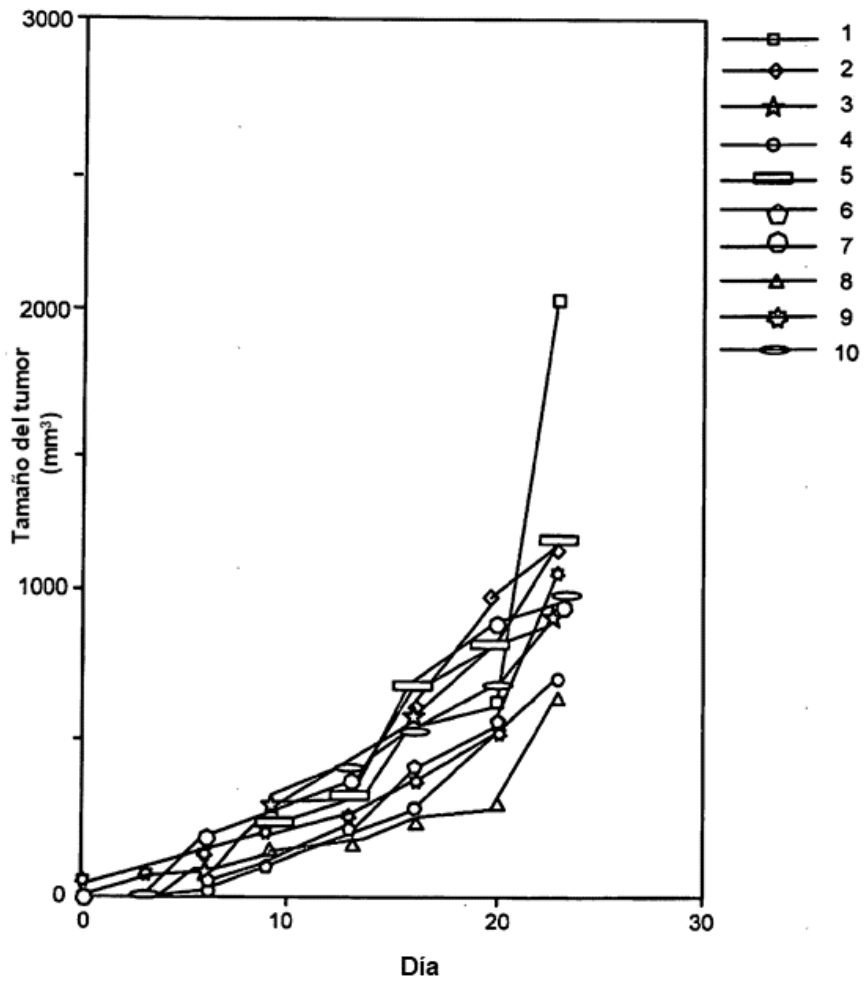


FIGURA 5

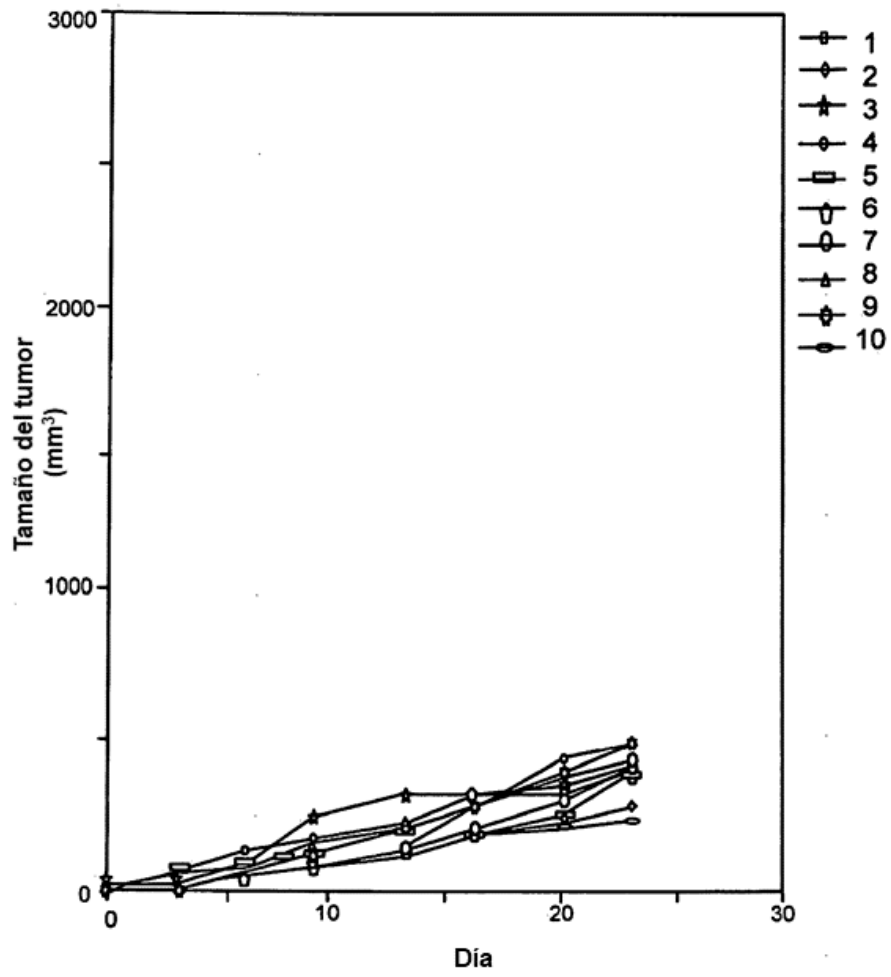


FIGURA 6

FIG. 7

Tinción con azul de Coomassie de los 31.1 n.º, n.º 6 humanizaos sobre gel SDS-PAGE)

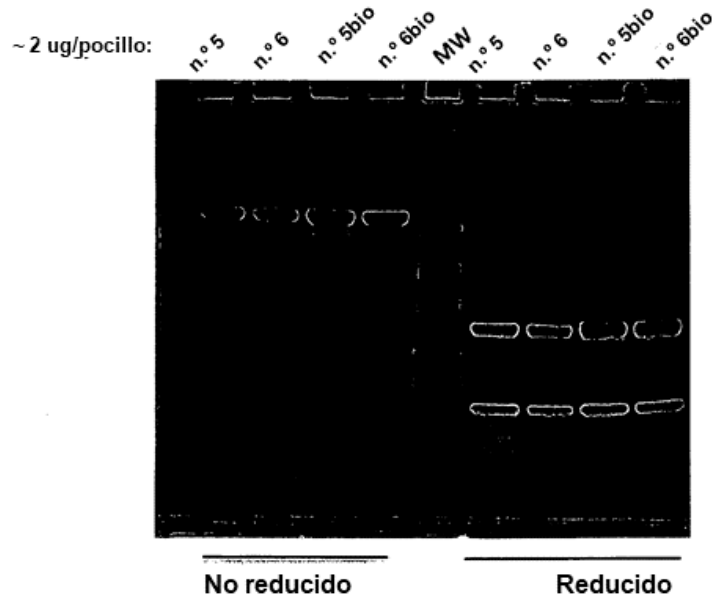


FIG. 8

ELISA de unión a 31.1

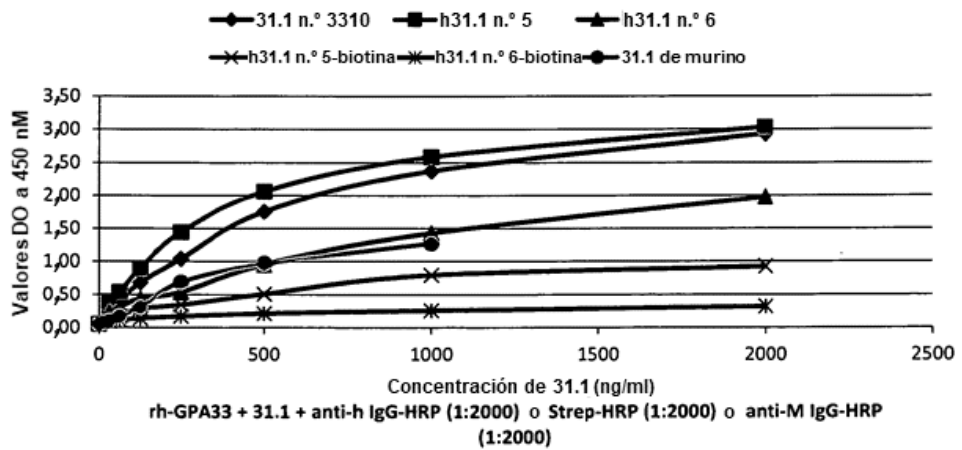


FIG. 9

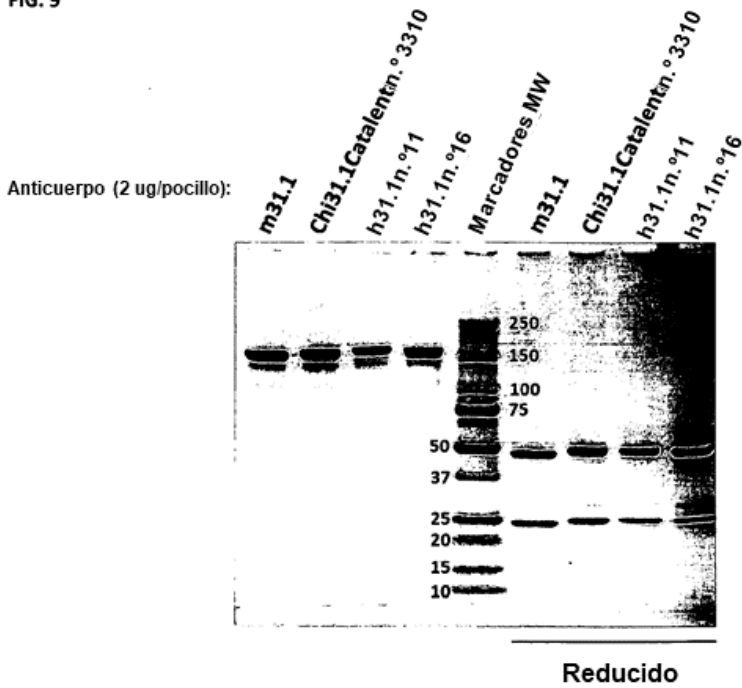


FIG. 10

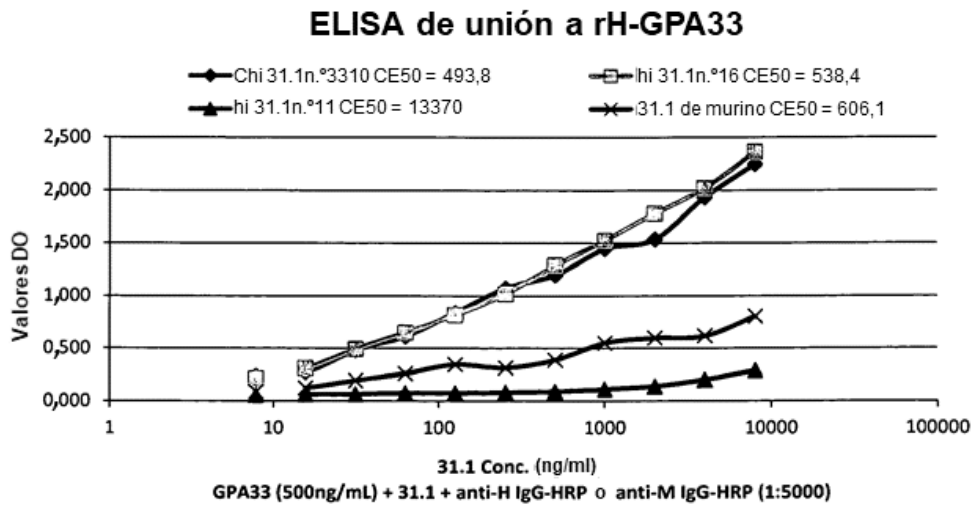


FIG. 11.

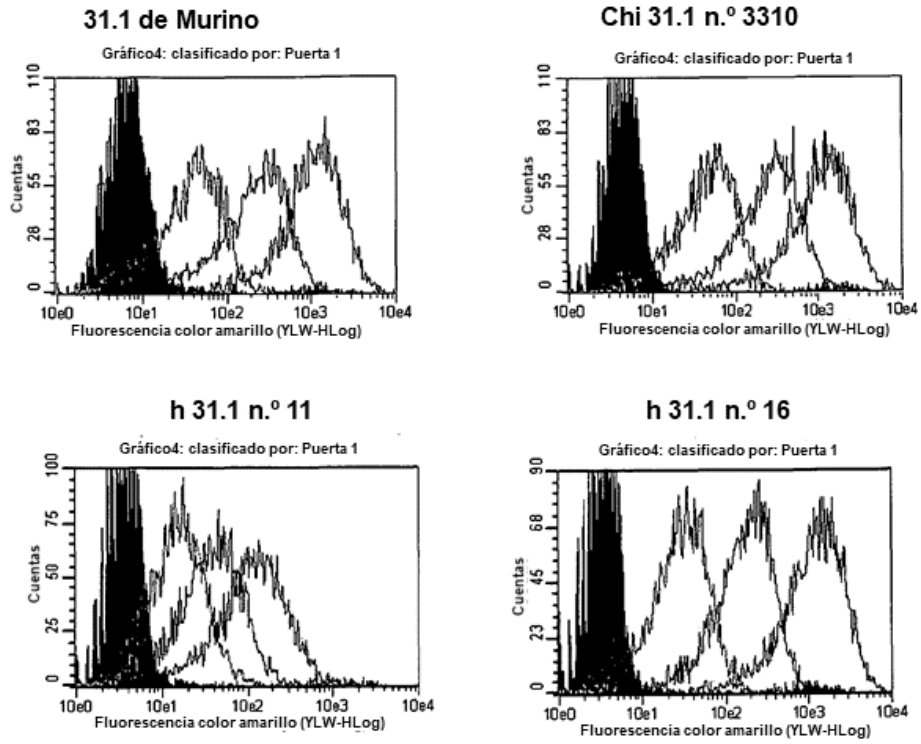




FIG. 12

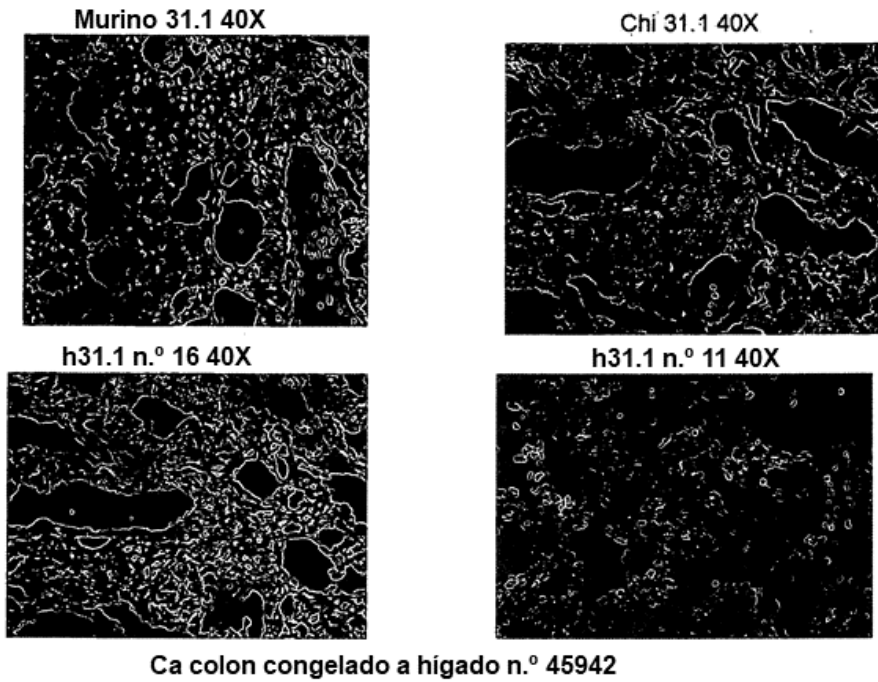


FIG. 13

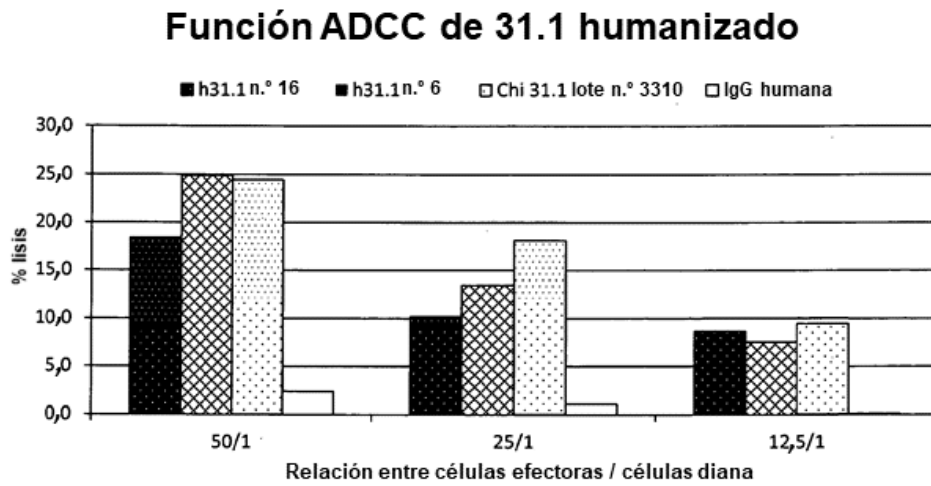


FIG. 14

**Efecto antitumoral del anticuerpo 31.1 humanizado en línea de células de cáncer pancreático en el modelo de exoinjerto de ratón AsPC-1**

