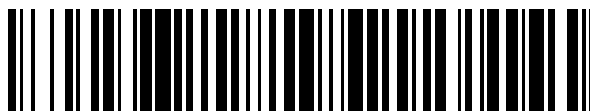


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 866**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/40** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/EP2015/058098**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.10.2015 WO15158729**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15715289 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.02.2019 EP 3131930**

54 Título: **Anticuerpos que reconocen el dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y sus usos para el diagnóstico del cáncer**

30 Prioridad:

**14.04.2014 FR 1453333**

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

**30.05.2019**

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.) (33.3%)**

**3, rue Michel-Ange**

**75016 Paris, FR;**

**INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE (INSERM) (33.3%) y UNIVERSITÉ PAUL SABATIER TOULOUSE III (33.3%)**

72 Inventor/es:

**CAZAUX, CHRISTOPHE;**

**VIDAL-FERNANDEZ, ANNE y**

**HOFFMANN, JEAN-SÉBASTIEN**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 714 866 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 que reconocen el dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y sus usos para el diagnóstico del cáncer

5 La presente descripción se refiere al campo del cáncer que incluye el diagnóstico y el pronóstico del cáncer, así como a la selección del tratamiento quimioterapéutico. Más particularmente, la presente descripción se refiere a nuevos anticuerpos capaces de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Zeta o Pol  $\theta$  (codificada por el gen *POLQ*), a las secuencias peptídicas correspondientes, así como a las secuencias nucleotídicas que codifican estos anticuerpos. La descripción se refiere al uso de estos anticuerpos, así como a los métodos correspondientes, para la detección, el diagnóstico y el pronóstico de trastornos patológicos hiperproliferantes asociados con la expresión, particularmente la expresión anómala, de la ADN polimerasa Zeta. La descripción también trata de productos, composiciones y/o kits que comprenden al menos un anticuerpo según la descripción para el diagnóstico, el pronóstico o la vigilancia y el seguimiento de la terapia de cánceres, en particular los cánceres sólidos, más particularmente incluso los cánceres de mama, pulmón o colon.

15 El cáncer es una patología en la que un grupo de células se desarrollan de forma incontrolable, que implica una invasión y una destrucción de los tejidos adyacentes, creando también en ocasiones metástasis vía una dispersión en el organismo por la linfa o la sangre. Estos tres parámetros que definen un cáncer son diferentes de los que caracterizan un tumor benigno, que no es invasivo ni genera metástasis.

Existen muchos métodos para el tratamiento del cáncer, ya sea mediante cirugía, radioterapia, quimioterapia o una combinación de estos.

20 La selección de un tratamiento adecuado es esencial para el paciente. Por lo tanto, es primordial saber en que momento iniciar un protocolo de tratamiento pesado y agresivo para prevenir la evolución de un cáncer agresivo. Por otro lado, cuando el tumor no lo requiere, un tratamiento intenso y agresivo representa necesariamente una desventaja terapéutica para el paciente. De hecho, tales tratamientos inducen diversas toxicidades y efectos secundarios que tienen un impacto significativo sobre la calidad de vida del paciente y son también costosos en la mayoría de los casos. Por lo tanto, estos tratamientos no deben iniciarse más que cuando sean indispensables y/o útiles.

30 Hasta la fecha, la selección del tratamiento para tumores sólidos se basa en el estadio tumoral utilizando el ensayo TNM de *The American Joint Committee on Cancer*. El estadio TNM atribuye un número (I a IV) basado en la combinación de tres características: T identifica el tamaño del tumor, N el número de nódulos linfáticos y M la existencia y localización de las metástasis. Dependiendo de la localización tumorales, la combinación de los tres marcadores TNM permite establecer un estadio (de I a IV). Cuanto más alto es el estadio, más avanzado está el cáncer y presagia un resultado desfavorable.

35 Aunque reconocida internacionalmente, esta clasificación no permite la identificación de cánceres en todos sus primeros estadios de progresión tumoral. Además, el estadio TNM no da más que una información parcial sobre la agresividad del tumor y solo tiene una utilidad limitada para el pronóstico.

40 Se han descrito diferentes proteínas y marcadores genéticos para afinar el pronóstico. En particular, el análisis de la expresión génica permitió la identificación de huellas genéticas. Sin embargo, las informaciones recopiladas en varios estudios son frecuentemente confusas (véase, por ejemplo, Lenz, *Gastrointest Cancer Res*, 1 (4 Suppl 2): S29-32, 2007; Walther et al., *Nat Rev Cancer*, 9 (7): 489-99, 2009). La solidez de las huellas multigénicas es cuestionable porque concierne a los genes del ciclo celular y añade poca información respecto al estadio TNM.

Por lo tanto, existe la necesidad de mejores ensayos de pronóstico del cáncer, no solo para mejorar la supervivencia de los pacientes, sino también su calidad de vida y para reservar protocolos pesados, agresivos y costosos solo cuando sea necesario y beneficioso para el paciente. Existe la necesidad de un ensayo monogénico que se pueda usar de manera repetible, fácil y fiel para el pronóstico de diversos tipos de cánceres.

45 Durante la proliferación celular normal, la replicación del ADN está asegurada por 3 ADN polimerasas (Pol $\alpha$ , Pol $\delta$  y Pol $\epsilon$ ). Sin embargo, se han identificado otras 13 ADN polimerasas en las células humanas. Se trata de polimerasas especializadas y cuyas funciones son poco conocidas. También parece que estas polimerasas son altamente mutágenas y que su actividad está estrechamente controlada.

50 La ADN polimerasa Pol Zeta (codificada por el gen *POLQ*) es una de estas ADN polimerasas y contiene un dominio helicasa en el lado N-terminal y un dominio polimerasa en el lado C-terminal. Aunque su función sea poco conocida, parece estar implicada en el mantenimiento de la estabilidad del genoma y en la reparación del ADN (Seki et al., *EMBO J*, 23: 4484-4494, 2004; Masuda et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102: 13986-13991, 2005; Yoshimura et al., *Mol. Cell*, 24: 115-125, 2006), pero también en la iniciación de la replicación del ADN. La expresión del ARNm Pol Q ha sido analizada en varios tumores (Kawamura et al., *Int J Cancer*, 109: 9-16, 2004; Pillaire et al., *Oncogene*, 29 (6): 876-887, 2010; Lemée, Bergoglio et al., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 107 (30): 13390-5, 2010; Higgins et al., *Oncotarget*, 1 (3): 175-184, 2010). Kawamura y sus colaboradores (Kawamura et al., *Int. J. Cancer*, 109: 9-16, 2004) compararon el nivel de expresión del ARNm Pol Q en diversos tejidos tumorales y encontraron que es apenas

detectable en los tejidos no tumorales, pero que está sobre-expresada en los tejidos tumorales de pulmón, estómago y colon. Los autores también indicaron que la sobre-expresión del ARNm Pol Q está correlacionada con un pronóstico vital desfavorable.

5 Se ha demostrado que la desregulación en tumores de mama y pulmón de los genes implicados en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, cuya ADN polimerasa POL Q, estaba asociada al pronóstico vital de los pacientes afectados, independientemente de los marcadores clínicos convencionales (Lemée, F., Bergoglio, V. et al., (2010) *DNA polymerase  $\theta$  up-regulation is associated with poor survival in breast cancer, perturbs DNA replication and promotes genetic instability, Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107 (30): 13390-13395, Allera-Moreau, C., et al., (2012) *DNA replication stress response involving PLK1, CDC6, POLQ, RAD51 and CLASPIN upregulation prognoses the outcome of early/mid-stage non-small cell lung cancer patients. Oncogenesis* 1 (10): e30).

También se ha demostrado recientemente que la expresión de este biomarcador, POL Q, perturba el desarrollo normal de la duplicación del ADN, instaurando un "estrés replicativo" (Lemée, F., Bergoglio, V., et al., 2010). Además, el estrés replicativo es un episodio precursor y "motor" de la carcinogénesis en sus estadios más precoces. (Pillaire, M.J., et al., (2007) *Up-regulation of error prone DNA polymerases beta and kappa slows down fork progression without activating the replication checkpoint, Cell Cycle* 6: 471-7 - Rey, L., et al., (2009) *Human DNA polymerase eta is required for common fragile site stability during unperturbed DNA replication, Mol Cell Biol* 29: 3344-3354 - Bartkova, J., et al., (2005). *DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis, Nature* 434: 864-70 - Gorgoulis, V. G., et al., (2005) *Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. Nature* 434: 907-913 - Bartkova, J., et al., (2006) *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoint. Nature* 444: 633-637).

15 En este sentido, este biomarcador anticiparía la proliferación celular (antes de dividirse, la célula debe duplicar su genoma) y, por lo tanto, tiene una ventaja original sobre los marcadores clínicos convencionales o en desarrollo, los cuales miden la proliferación o la desdiferenciación celular y, por lo tanto, no ponen de manifiesto más que la consecuencia y no la causa.

25 También se ha descrito la preparación de anticuerpos policlonales de conejo que reconocen el dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, así como su uso para la detección de la proteína por inmunotransferencia (Seki, Mineaki, Federica Marini and Richard D. Wood. "POLQ (Pol  $\theta$ ), a DNA polymerase and DNA-dependent ATPase in human cells". *Nucleic Acids Research* 31.21 (2003): 6117-6126).

30 Los médicos clínicos están esperando herramientas para detectar estos biomarcadores, capaces de predecir tanto la agresividad del tumor sólido recién diagnosticado como la respuesta a los tratamientos terapéuticos convencionales.

En la actualidad, no hay herramientas de detección de biomarcadores que se puedan usar habitualmente en un entorno clínico. En el campo del cáncer de mama existen dos ensayos genéticos: Oncotype® y MammaPrint®. En ambos casos se trata de marcadores de proliferación celular y no de estabilidad del genoma. Por lo tanto, aportan poco valor añadido en comparación con la clasificación clínico-patológica habitual (la citada TNM). Además, se trata de huellas multigénicas que son muy difíciles de "popularizar" (necesidad de equipos de PCR en tiempo real múltiple, cuantificación difícil, no es posible un análisis de anatomía patológica extemporáneo) y, por lo tanto, solo son posibles en estructuras hospitalarias avanzadas. De hecho, estas técnicas de diagnóstico y/o pronóstico no son utilizables ni transferibles en las estructuras terapéuticas de todos los hospitales o laboratorios de anatomía patológica, especialmente los de "ciudad". Para las pruebas de diagnóstico basadas en el uso de anticuerpos, éstas se basan en técnicas de transferencia de Western que implican la extracción de proteínas de la muestra, su desnaturalización, su separación por electroforesis y la transferencia a membrana antes del revelado de la proteína de interés usando anticuerpos comerciales. Estos anticuerpos comerciales no son funcionales en inmunohistoquímica en los cortes de tejido que se han de analizar de forma extemporánea, porque no pueden reconocer la proteína en su conformación natural y en su entorno de tejido/célula.

45 La gran mayoría de los marcadores actuales, moleculares o clínicos, en realidad indican el estado de "proliferación" y de "diferenciación" del tumor, es decir, su capacidad para dividirse rápidamente. De hecho, se han descubierto generalmente después del genotipado (chips Affymetrix) que lógicamente seleccionaron los episodios genéticos "pasajeros" - es decir, las consecuencias - y no "los productores" - es decir las causas - del tumor ya desarrollado.

50 Además, a pesar de los avances asociados a la detección y a las técnicas quirúrgicas, la mortalidad asociada a los cánceres de mama y pulmón sigue siendo muy alta; siendo el cáncer de pulmón el cáncer más mortal en los hombres y el cáncer de mama el más mortal en las mujeres.

Los médicos oncólogos, incluso cuando el tumor ha sido detectado en forma precoz, no tienen actualmente marcadores clínicos y las herramientas necesarias para establecer un pronóstico vital fiable y predecir la respuesta quimioterapéutica. En ausencia de tales marcadores, frecuentemente es difícil adaptar los tratamientos individualizados apropiados y modular la "carga" terapéutica.

55 Por lo tanto, los profesionales esperan la llegada al mercado de herramientas para la identificación y el seguimiento de marcadores de un nuevo tipo que se puedan usar fácilmente de forma habitual, que les permitiría evitar así

tratamientos pesados y mutágenos para sus pacientes y/o adaptar la quimioterapia según la respuesta individual esperada.

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar una herramienta de detección de biomarcadores de un nuevo tipo, fácil y rápida de implementar.

5 Por lo tanto, la presente descripción tiene por objeto proporcionar al menos un producto que se pueda usar como herramienta de diagnóstico y/o pronóstico o de vigilancia de trastornos patológicos hiperproliferantes, por ejemplo, cáncer, particularmente los caracterizados por una expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta o causados por una expresión anómala de la ADN polimerasa Pol Zeta.

10 Más particularmente, la descripción tiene por objeto proporcionar herramientas utilizables habitualmente, y en particular en inmunohistoquímica, en muestras de tejido de un paciente sano, de un paciente susceptible de estar padeciendo un cáncer o de un paciente que padezca cáncer.

Por lo tanto, la presente descripción proporciona al menos un anticuerpo, particularmente al menos un anticuerpo monoclonal, capaz de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta.

15 También la presente invención se refiere a un anticuerpo monoclonal caracterizado por que se selecciona del grupo que comprende los siguientes anticuerpos:

- i. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
- ii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
- 20 iii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta.

Más particularmente, la invención se define en las reivindicaciones.

25 Los anticuerpos según la descripción tienen la capacidad de poder ser usados con fines de diagnóstico y/o pronóstico. En una forma preferida, el al menos un anticuerpo según la presente descripción, particularmente monoclonal, es capaz de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y permitir la detección de esta ADN polimerasa por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, preferiblemente inmunohistoquímica.

30 Sorprendentemente y al contrario de los anticuerpos comerciales, los anticuerpos según la presente descripción tienen la propiedad notable de poder unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta en su forma completa en transferencia de Western y no solo una forma truncada o una de sus fracciones. La capacidad de unión de los anticuerpos según la presente descripción se manifiesta en particular en células o cortes histológicos de tejidos obtenidos de un paciente. Esta capacidad de unión puede, por lo tanto, ser revelada y evaluada por técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia. Como se indicó anteriormente, los anticuerpos comerciales o los de la técnica anterior (en particular los anticuerpos policlonales descritos por Seki et al., (*Nucleic Acid Research*, 2003, 6117-6126) no son funcionales en inmunohistoquímica sobre cortes de tejido para ser analizados de forma extemporánea porque son incapaces de reconocer y, por lo tanto, localizar la proteína en su conformación natural y/o en su entorno de tejido/célula.

En una forma de realización, los anticuerpos según la descripción son anticuerpos monoclonales.

40 En uno de sus aspectos, la descripción se refiere a anticuerpos aislados, a uno de sus derivados o fragmentos funcionales que tiene la capacidad de unión antigénica, y que se une al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta. Por lo tanto, la descripción se refiere a al menos un anticuerpo según la descripción para su uso para diagnóstico *in vitro* o *ex vivo* de un trastorno asociado a la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta.

En un modo realización de la presente descripción, el trastorno asociado a la expresión de la DNA polimerasa Pol Zeta es cáncer.

45 En un modo de realización de la presente descripción, el anticuerpo monoclonal según la descripción se caracteriza así por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Zeta en el seno de células o cortes histológicos de tejidos.

50 En un modo de realización particular de la presente descripción, los anticuerpos monoclonales según la descripción se caracterizan por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y permitir la detección de la ADN polimerasa Pol Zeta por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, preferentemente por inmunohistoquímica.

En otro modo de realización particular de la presente descripción, los anticuerpos monoclonales según la descripción, capaces de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, permiten la detección de la ADN polimerasa Pol Zeta por transferencia de Western.

5 En un modo de realización particular de la presente descripción, los anticuerpos monoclonales según la descripción, capaces de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, permiten la detección de la ADN polimerasa Pol Zeta por inmunoprecipitación.

La presente descripción también se refiere a anticuerpos, sus derivados o fragmentos funcionales, obtenidos por recombinación genética o síntesis química.

10 En un modo de realización particular, los anticuerpos según la presente descripción son anticuerpos monoclonales. Un anticuerpo monoclonal corresponde a una población de anticuerpos idénticos dirigidos contra el mismo epítipo de un antígeno. Estos anticuerpos se producen en cultivo por un clon de linfocitos B según la técnica de hibridomas o por una célula hospedante transfectada con ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo en cuestión. Después de haber inmunizado un ratón, por ejemplo, contra un antígeno dado, se extraen linfocitos B de su bazo. Dichos linfocitos se fusionan con plasmocitos tumorales inmortalizados. Después de la selección, los hibridomas, así  
15 obtenidos son una fuente permanente y estable de un solo tipo de anticuerpo monoclonal. La especificidad de los anticuerpos monoclonales es mayor que la de los sueros policlonales. Un anticuerpo monoclonal se caracteriza generalmente por cadenas pesadas de una y solo una clase y subclase y cadenas ligeras de un solo tipo.

20 Los antígenos utilizados para obtener los anticuerpos según la descripción incluyen secuencias de aminoácidos o péptidos del dominio central de la proteína ADN polimerasa Pol Zeta. Se eligen ventajosamente entre los subdominios tridimensionales de la proteína que presentan criterios de exposición externa y, por lo tanto, de accesibilidad, pero también según un equilibrio hidrofobia/hidrofilia de dichos subdominios del dominio central, según el impedimento estérico y la polaridad de los diferentes grupos, pero también según las interacciones electrostáticas e hidrógeno. Esta evaluación se puede realizar por una modelización de la estructura tridimensional y plegamiento de la proteína utilizando herramientas predictivas constituidas por programas informáticos conocidos por los expertos  
25 en la técnica a partir de la secuencia peptídica de la proteína.

30 Por lo tanto, han sido determinadas las secuencias de aminoácidos o péptidos correspondientes a las mostradas en la Tabla 1 y los péptidos correspondientes usados para llevar a cabo la inmunización de ratones para la producción de anticuerpos según la descripción. Estas secuencias peptídicas corresponden a los epítopos antigénicos reconocidos por los anticuerpos según la presente descripción y están localizadas al principio o al final del dominio central de la proteína ADN polimerasa Pol Zeta.

Tabla 1: Péptidos utilizados para la inmunización y las secuencias de aminoácidos correspondientes reconocidas por los anticuerpos según la descripción

| Péptidos  | Secuencias de aminoácidos | SEQ ID N° |
|-----------|---------------------------|-----------|
| Péptido 1 | CKHSPNIVQDLNKSREHTSS      | 1         |
| Péptido 2 | CSIFRARKRASLDINKEKPG      | 2         |
| Péptido 3 | CLQEDLIKSNVNNENQDTH       | 3         |
| Péptido 4 | HDETSSLLPRKESNIVDDNGC     | 4         |

35 Los anticuerpos obtenidos son los anticuerpos 1B1, 18E1, 10B2 y 15G9 que reconocen, respectivamente, las secuencias de aminoácidos o péptidos 2, 4, 1 y 4. Hasta cierto punto, el anticuerpo 10B2 reconoce también la secuencia de aminoácidos 2, pero más débilmente.

40 Una inmunoglobulina de tipo G (IgG) pertenece a una clase de moléculas anticuerpos. Un anticuerpo IgG consiste típicamente en dos cadenas pesadas idénticas y dos cadenas ligeras idénticas. Cada cadena pesada y ligera incluye un dominio constante y un dominio variable. Las 2 cadenas pesadas (H por *heavy*) y las 2 cadenas ligeras (L por *light*) que están interconectadas por un número variable de puentes disulfuro aseguran la flexibilidad de la molécula. Estas cadenas forman una estructura en Y (cada cadena ligera constituye la mitad de un brazo de la Y). Cada cadena ligera está constituida por un dominio constante y un dominio variable; las cadenas pesadas están compuestas por un fragmento variable y 3 o 4 fragmentos constantes. Para un anticuerpo dado, las dos cadenas pesadas son idénticas, al igual que las dos cadenas ligeras.

45 Cada dominio de variable contiene 3 segmentos denominados Región Determinante de la Complementariedad o abreviadamente CDR (por la expresión en inglés) o incluso región hipervariable. En la presente descripción, se hará referencia a CDR cuando se haga referencia a una sola o a más de una CDR.

Las CDR son responsables de la unión específica al epítipo del antígeno. Existen 3 CDR en cada cadena pesada y en cada cadena ligera. Se identifican clásicamente como CDR1, CDR2 y CDR3, numeradas secuencialmente desde el N terminal.

Las porciones más conservadas de los dominios variables se denominan "regiones marco" (*framework region*).

- 5 Según la presente descripción, las CDR de los anticuerpos se definen según la nomenclatura IMGT (Sistema internacional de información de inmunogenética). El sistema de numeración IMGT se ha definido para comparar dominios variables independientemente de la especie. Según el sistema IMGT, los aminoácidos conservados tienen siempre la misma posición, por ejemplo, cisteína 23, triptófano 41, un aminoácido hidrófobo 89, cisteína 104, fenilalanina o triptófano 118. El sistema de numeración IMGT proporciona una delimitación normalizada de las regiones marco y de las CDR. Así, la CDR1 corresponde a la fracción de los residuos 27 a 38, la CDR2 a la de los residuos 56 a 65 y la CDR3 a la de los residuos 105 a 117 (Lefranc et al., *Nucl. Acids Res.* (1999) 27 (1): 209-212).

En un modo de realización, el anticuerpo monoclonal según la descripción capaz de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos siguientes:

- 15 a. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
- b. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
- c. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN

20 En un modo de realización, el anticuerpo monoclonal según la descripción capaz de unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta se selecciona del grupo que consiste en los anticuerpos siguientes:

- a. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 21, SEQ ID 22, SEQ ID 23, SEQ ID 24, SEQ ID 25, SEQ ID 26,
- 25 b. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 5, SEQ ID 6, SEQ ID 7, SEQ ID 8, SEQ ID 9, SEQ ID 10,
- 30 c. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 13, SEQ ID 14, SEQ ID 15, SEQ ID 16, SEQ ID 17, SEQ ID 18,
- d. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 29, SEQ ID 30, SEQ ID 31, SEQ ID 32, SEQ ID 33, SEQ ID 34.

Preferiblemente, el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- 40 i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR3H1, CDR3H2 y CDR3H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 21, SEQ ID 22 y SEQ ID 23,
- ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR3L1, CDR3L2 y CDR3L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 24, SEQ ID 25 y SEQ ID 26.

Preferiblemente también el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- 45 i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR1H1, CDR1H2 y CDR1H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7,
- ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR1L1, CDR1L2 y CDR1L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 8., SEQ ID 9 y SEQ ID 10.

Incluso más preferiblemente el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa POL Q comprende:

- i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR2H1, CDR2H2 y CDR2H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 13, SEQ ID 14 y SEQ ID 15
- 5 ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR2L1, CDR2L2 y CDR2L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 16, SEQ ID 17 y SEQ ID 18.

Preferiblemente el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- 10 i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR4H1, CDR4H2 y CDR4H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 29, SEQ ID 30 y SEQ ID 31,
- ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR4L1, CDR4L2 y CDR4L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 32, SEQ ID 33 y SEQ ID 34.

En una variante incluso preferida, el anticuerpo según la presente invención se elige entre:

- 15 a. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
  - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR3H1, CDR3H2 y CDR3H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 21, SEQ ID 22 y SEQ ID 23,
  - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 28,
- 20 b. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
  - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR1H1, CDR1H2 y CDR1H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7,
  - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 12,
- 25 c. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa POL Q que comprende:
  - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR2H1, CDR2H2 y CDR2H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 13, SEQ ID 14 y SEQ ID 15,
  - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 20,
- 30 d. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
  - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR4H1, CDR4H2 y CDR4H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 29, SEQ ID 30 y SEQ ID 31,
  - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 36.

En un modo de realización particularmente preferido, el anticuerpo según la descripción se elige entre:

- 35 a. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
  - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR3L1, CDR3L2 y CDR3L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 24, SEQ ID 25 y SEQ ID 26,
  - ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 27,
- 40 b. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
  - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR1L1, CDR1L2 y CDR1L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 8, SEQ ID 9 y SEQ ID 10,
  - ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 11,

c. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR2L1, CDR2L2 y CDR2L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 16, SEQ ID 17 y SEQ ID 18,
- 5 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 19,

d. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR4L1, CDR4L2 y CDR4L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 32, SEQ ID 33 y SEQ ID 34,
- 10 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 35.

En un modo de realización aún más preferido, el anticuerpo según la descripción se elige entre:

a. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 27,
- 15 ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 28,

b. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 11,
- ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 12,

20 c. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:

- i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 19,
- ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 20,

25 d. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:

- i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 35,
- ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 36.

En una forma preferida de la descripción, el anticuerpo es el anticuerpo 1B1 que comprende:

- i. una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID 39,
- 30 ii. una cadena-ligera que comprende la secuencia SEQ ID 40.

En una forma preferida de la descripción, el anticuerpo es el anticuerpo 18E1 que comprende:

- i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 41,
- ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 42-

En una forma preferida de la descripción, el anticuerpo es el anticuerpo 10B2 que comprende:

- 35 i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 37,
- ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 38.

En una forma preferida de la descripción, el anticuerpo es el anticuerpo 15G9 que comprende:

- i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 43,
- 40 ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 44.



Los anticuerpos según la presente descripción tienen la notable propiedad de poder unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, en forma completa no truncada, o isoformas de la proteína, en particular en su entorno de tejido endógeno, más particularmente incluso en el seno de cortes histológicos de tejidos extraídos de una muestra de un sujeto (espécimen operatorio o biopsia) en los que se desea diagnosticar un cáncer, pronosticar la evolución de un cáncer y/o orientar el tratamiento con quimioterapia. Esta propiedad de unión al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta se puede observar por transferencia de Western, por inmunohistoquímica, por inmunofluorescencia, así como por inmunoprecipitación, particularmente inmunohistoquímica.

Los anticuerpos según la presente descripción tienen, por lo tanto, la propiedad particularmente ventajosa e inesperada de poder unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, no solo por transferencia de Western, es decir, en la proteína desnaturizada y transferida a una membrana, sino también y especialmente en el entorno celular y/o celular endógeno de la proteína que, por lo tanto, se encuentra en su conformación completa, cerca de la conformación natural, no truncada y, por lo tanto, permite su detección y su localización tisular/celular por técnicas de inmunohistoquímica, por ejemplo, inmunofluorescencia, en el seno de cortes histológicos de tejidos sanos o cancerosos.

Esta propiedad permite por tanto la localización histológica de la proteína ADN polimerasa Pol Zeta en muestras de tejidos o células. Esto no es posible con los anticuerpos de la técnica anterior que funcionan solo según la tecnología de transferencia de Western que implica la lisis celular y la desnaturización de proteínas. Además, esta técnica de transferencia de Western no permite la localización celular ni tisular de la proteína, puesto que se tritura la muestra.

Los ejemplos de la presente descripción ilustran estas propiedades de los anticuerpos según la descripción. Por lo tanto, una diferencia importante entre los anticuerpos de la presente descripción y los de la técnica anterior es permitir la detección, la localización histológica y la cuantificación, en cortes y/o muestras de células y tejidos, de la proteína ADN polimerasa Pol Zeta.

Dicha propiedad ilustra bien la solución al problema que la presente descripción se propone resolver, que, como se indicó anteriormente, tiene como objetivo proporcionar herramientas que se puedan usar como herramienta para diagnóstico y/o pronóstico o para la vigilancia de trastornos patológicos hiperproliferantes. por ejemplo, cáncer, particularmente los caracterizados por una expresión de ADN polimerasa Pol Zeta o provocados por una expresión anómala de la ADN polimerasa Pol Zeta y más particularmente herramientas que se puedan usar de manera habitual y preferiblemente en inmunohistoquímica en muestras de tejido de un paciente sano, de un paciente susceptible de padecer cáncer o de un paciente que padece cáncer.

En un modo de realización de la presente descripción, el anticuerpo monoclonal según la descripción se caracteriza así por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Zeta en el seno de células o cortes histológicos de tejidos.

En un modo de realización particular de la presente descripción, los anticuerpos monoclonales según la descripción se caracterizan por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y permitir la detección de la ADN polimerasa Pol Zeta por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, preferentemente por inmunohistoquímica.

En histología humana, la toma de muestras de tejido que se desea evaluar se puede realizar en especímenes quirúrgicos o por biopsia.

La fijación de estas tomas de muestras tiene por objeto conservar las estructuras. De hecho, la toma de muestras de tejidos provoca su muerte, lo que puede conducir a la autodigestión del tejido o a la putrefacción de los tejidos por contaminación. El interés de la fijación radica en la inmovilización de los constituyentes tisulares/celulares, evita la autólisis celular, la putrefacción bacteriana *post-mortem* y permite técnicas histológicas, así como las tinciones posteriores.

Las técnicas de fijación no son críticas y son bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, un fijador bien conocido en microscopía óptica es el formaldehído.

La duración y la cantidad de fijador dependen de la cantidad de tejido que se ha de fijar. Estos parámetros no son críticos en el contexto de la presente descripción y son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Para que la luz pase a través del tejido a examinar, debe ser muy delgado y sólido. Esto se puede obtener por técnicas de inclusión. La inclusión de parafina consiste en infiltrar y cubrir con parafina los tejidos que se han de examinar. La inclusión va precedida por dos etapas. Primero es necesario proceder a la deshidratación pasando los tejidos por baños de alcohol de grado creciente (70°, 80°, 90°, 95°, 99°, 100°). El interés de la deshidratación es eliminar el fijador. El alcohol (etanol) se reemplaza luego por un disolvente miscible con parafina. Puede ser, por ejemplo, xileno o tolueno. Estas sustancias eliminan el etanol. A medida que se infiltran con el disolvente, los tejidos tienden a desteñirse. Una vez totalmente impregnado, el tejido se coloca en parafina fundida (llevada a 56/58°C); el calor provoca la evaporación del disolvente (y su disolución en la parafina): los espacios así liberados se llenan con parafina. Los tejidos cubiertos de parafina se colocan en pequeños moldes, a temperatura ambiente, lo que provoca

el endurecimiento de la parafina y, por lo tanto, la rigidez de los fragmentos de tejido extraídos. Luego se procede al desmoldeo: se obtienen fragmentos de tejido incluidos en un bloque de parafina.

5 Para aislar cortes a partir del bloque de parafina, se usa un microtomo que hace avanzar el bloque sobre una cuchilla: el bloque avanza cada vez aproximadamente 2 a 3  $\mu\text{m}$ . El conjunto de las rebanadas va formando una cinta en la que hay cortes en serie de muestras de tejido. Los cortes se pegan luego calentándolos sobre portaobjetos de vidrio.

10 Los tejidos del organismo no se colorean espontáneamente, lo que dificulta las observaciones. Sin embargo, para que se pueda usar una coloración, se debe eliminar la parafina. Se procede pues al desparafinado que consiste en pasar los portaobjetos por baños de tolueno o xileno para disolver la parafina. Luego se lleva a cabo una rehidratación: el alcohol se mezcla con agua y tolueno, y los portaobjetos se pasan por baños de alcohol de grado decreciente.

El uso de tejidos congelados o tejidos fijados e incluidos en parafina se contempla dentro del alcance de la presente descripción.

15 En el caso de tejidos congelados, convendrá realizar cortes con criostato; en este caso, la morfología estará menos bien conservada que en los cortes fijados e incluidos en parafina. Un interés es poder conservar epítomos que podrían haber sido destruidos por los procesos de fijación e inclusión. Sin embargo, el uso de inmunohistoquímica en cortes congelados tiende a disminuir, por un lado, debido a la fabricación de anticuerpos que reconocen epítomos resistentes a la fijación, y por otro lado debido al tamaño y a logística necesarios para este método de conservación.

20 De manera ventajosa, pero no obligatoria, los tejidos fijados incluidos en parafina se utilizarán en el contexto de la presente descripción. Las ventajas son el uso posterior cuando el tejido ha sido fijado y la posibilidad de estudios retrospectivos (en bloques o portaobjetos), así como una morfología bien conservada.

Las técnicas de inmunomarcaje se asimilan a las técnicas de coloración; se pueden usar anticuerpos acoplados a sustancias que se pueden revelar por microscopía (enzimas, sustancias fluorescentes, ...).

25 La inmunohistoquímica (o "IHC") es el nombre de un método para localizar proteínas en células en el seno un corte de tejido por medio de anticuerpos capaces de revelar dichas proteínas.

La inmunohistoquímica explota la capacidad de un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno en los tejidos biológicos. Los anticuerpos pueden ser de origen policlonal o monoclonal. La inmunohistoquímica (o inmunocitoquímica) consiste en detectar en los tejidos o células el sitio de la unión de un anticuerpo específico a la proteína contra la cual se dirige.

30 En inmunohistoquímica, la especificidad de la interacción anticuerpo-antígeno se utiliza para identificar selectivamente proteínas específicas que se encuentran en células o cortes de tejido. Esta técnica se puede utilizar en células fracturadas o en cortes de tejidos congelados o fijados.

La ventaja de esta técnica es detectar antígenos (proteínas con mayor frecuencia) de interés a nivel celular o extracelular utilizando anticuerpos específicos.

35 La principal dificultad de la IHC es disponer de un buen anticuerpo específico que pueda alcanzar su epítomo en el corte. Ahora bien, es una propiedad de los anticuerpos según la presente descripción poder alcanzar y unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta en los cortes de tejidos y ser revelados por inmunohistoquímica.

40 La visualización de la interacción entre un anticuerpo según la descripción y el dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta se puede realizar por varios medios. En los casos más comunes, el anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo primario de la descripción está conjugado con una enzima, por ejemplo, peroxidasa, que tiene la capacidad de catalizar una reacción coloreada.

45 Alternativamente, la interacción puede ser detectada por inmunofluorescencia. "Inmunofluorescencia", tal como se usa en la presente solicitud, se refiere a una reacción antígeno-anticuerpo en la que el anticuerpo secundario está marcado con una molécula fluorescente (fluorocromo) y el complejo antígeno-anticuerpo formado se visualiza con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

50 En el contexto de la presente descripción, la inmunofluorescencia comprende inmunofluorescencia directa e inmunofluorescencia indirecta. En el caso de inmunofluorescencia directa, se utiliza un anticuerpo marcado directamente con un fluoróforo para detectar la ADN polimerasa Pol Zeta. En la inmunofluorescencia indirecta, un anticuerpo primario específico de la ADN polimerasa Pol Zeta es reconocido por un anticuerpo secundario unido a un fluorocromo.

Los fluorocromos son compuestos que absorben a una cierta longitud de onda y emiten a otra longitud de onda visible por fluorescencia. Los fluorocromos comunes son por ejemplo rodamina y lisamina. Cuando la fluoresceína (FITC) es excitada por una luz azul (longitud de onda 488 nm), emite una luz verde (520 nm). La ficoeritrina (PE)

emite una luz naranja (570 nm). Los fluorocromos utilizados comúnmente en inmunofluorescencia son, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (verde) e isotiocianato de tetrametil-rodamina (rojo).

5 La inmunofluorescencia directa en el corte por congelación es un método muy específico que evita todas las reacciones no específicas. Este es un método que requiere el uso de anticuerpos acoplados a un cromógeno fluorescente (fluoresceína, rodamina, rojo Texas ...).

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar anticuerpos como los descritos anteriormente que estén marcados o el anticuerpo secundario que los reconoce, en particular por acoplamiento con un cromógeno fluorescente.

10 En la coloración inmunohistoquímica directa, un anticuerpo etiquetado se une directamente a su antígeno. Aunque utiliza solo un anticuerpo y sea sencilla y rápida de implementar, la coloración inmunohistoquímica puede adolecer de una cierta falta de sensibilidad. Para el revelado de la inmunohistoquímica indirecta, las enzimas utilizadas pueden ser, por ejemplo, peroxidasa o fosfatasa alcalina, y los cromógenos son frecuentemente diaminobencidina (reacción de color pardo) o aminoetilcarbazol (3-amino, 9-etilcarbazol, AEC, reacción de color rojo).

15 La intensidad de la señal obtenida después del marcaje de una reacción antígeno-anticuerpo depende del número de moléculas coloreadas visibles.

20 Es común utilizar métodos indirectos, donde un anticuerpo secundario marcado reconoce al anticuerpo primario unido al antígeno. Varios anticuerpos secundarios pueden ser capaces de unirse a diferentes sitios antigénicos en el anticuerpo primario, amplificando así la señal a detectar. La reacción anticuerpo-antígeno se puede visualizar utilizando un agente reactivo terciario, tal como una enzima informadora (como la peroxidasa que cataliza una reacción de formación de color), un metal coloidal, una etiqueta radiactiva o un fluoróforo (como el rojo Texas o FITC). En el caso de un sistema enzimático informador, la adición de un sustrato adecuado (cromógeno), tal como AEC o DAB da como resultado la producción de un producto coloreado que tiñe la célula con peroxidasa como enzima informadora.

25 Son posibles varios mecanismos de amplificación, entre los cuales los métodos de tres capas, especialmente porque el anticuerpo intermedio divalente puede también servir para unirse a un complejo reactivo: por ejemplo, peroxidasa-antiperoxidasa, avidina-biotina-peroxidasa (o fosfatasa alcalina) y estreptavidina-biotina-peroxidasa. El número de moléculas reactivas se puede aumentar uniéndolas a un polímero o la amplificación se puede generar creando un complejo que multiplica las moléculas de enzima unidas de forma no covalente al anticuerpo (tiramida). La amplificación se puede proporcionar aumentando el tiempo de incubación y también por pretratamiento de cortes desparafinados por calor o enzimas.

30 A modo de ejemplo no limitativo de amplificación, se puede mencionar el método inmunoenzimático de tipo estreptavidina-biotina-peroxidasa: el anticuerpo primario se fija al antígeno, luego el anticuerpo secundario se fija al anticuerpo primario y lleva una molécula de biotina que se fija a un complejo de estreptavidina-peroxidasa. Existe otro método inmunoenzimático con amplificación de señal por un polímero: el anticuerpo primario se fija al antígeno, el anticuerpo secundario se fija al anticuerpo primario y se acopla a un polímero inerte que transporta varias moléculas de anticuerpo secundario y peroxidasa.

40 Otro modo de detección puede ser Duolink® (Olink Bioscience), que es una tecnología que permite la detección, visualización y cuantificación de interacciones entre proteínas, pero también proteínas solas, o modificaciones de proteínas en muestras de tejidos o de células preparadas para microscopía. La diana se detecta por medio uno (o dos) anticuerpo(s) primario(s) dependiendo de la aplicación. En el caso de que se usen dos anticuerpos primarios, se han producido en diferentes especies.

45 Esta técnica se basa en el PLA (*Proximity Ligation Assay*) *in situ*, que es una tecnología de ligación por proximidad. Utiliza dos anticuerpos secundarios, cada uno acoplado a un oligonucleótido y formando las sondas de PLA. La señal se genera solo cuando las dos sondas de PLA están fijadas próximas una a la otra, lo que permite la ligación y amplificación a partir de los oligonucleótidos. Estas sondas de PLA reconocen un solo anticuerpo primario o dos, estando fijados en la muestra estos anticuerpos primarios según el experimento. La señal obtenida es una mancha fluorescente o coloreada (para la detección en el corte de tejido del campo claro) que aparece en microscopía en el lugar donde ocurrió la ligación. Estas señales de PLA se pueden cuantificar (contar) y ser asignadas a una localización subcelular específica gracias al análisis de las imágenes obtenidas en microscopía.

50 Por supuesto, estos ejemplos no son limitativos y existen muchas técnicas o reactivos comerciales disponibles para revelar anticuerpos.

En un modo de realización, la presente descripción se refiere a uno o varios anticuerpos monoclonales de muridos.

55 La presente descripción también se refiere a derivados o fragmentos funcionales de los anticuerpos según la descripción, que tienen las mismas propiedades de unión antigénica que los anticuerpos según la presente descripción.

5 Por la expresión «derivados o fragmentos funcionales que tienen propiedades de unión antigénica» se entiende en particular estructuras de proteínas que tienen una capacidad de unión específica o idéntica a los anticuerpos según la descripción y que comprenden al menos uno, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, particularmente 6 de las CDR de un anticuerpo según la presente descripción, de modo que conservan la capacidad de unión al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta o a los epítomos. Por el término fragmento se entiende una parte del anticuerpo y por el término "derivado" se entiende cualquier estructura que comprenda el anticuerpo en el que está injertado otro anticuerpo u otra cadena peptídica, por ejemplo, del tipo armazón.

10 En particular, los compuestos derivados según la presente descripción pueden consistir en armazones proteicos, por ejemplo, del tipo de inmunoglobulina. Los expertos en la técnica están familiarizados con diversos métodos de construcción de armazones de péptidos, así como con medios de injerto de las CDR de los anticuerpos según la presente descripción con el fin de preservar las propiedades de reconocimiento y de unión a los epítomos del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, tales como se describe en la presente descripción.

]Otro aspecto de la presente descripción se refiere a fragmentos funcionales de anticuerpos según la presente descripción.

15 Los fragmentos funcionales de los anticuerpos según la presente descripción pueden ser, por lo tanto, fragmentos Fv, Fab, (Fab')<sub>2</sub>, Fab', scFv, scFv-Fc o dicho anticuerpo o cualquier fragmento cuya semivida haya sido aumentada, tales como fragmentos modificados por la adición de PEG.

Para mayor claridad, la Tabla 2 resume las secuencias correspondientes a los anticuerpos según la descripción.

ES 2 714 866 T3

Tabla 2: Secuencias SEQ ID N° de las secuencias proteicas de componentes de anticuerpos según la descripción

| Anticuerpo                     | Cadena pesada                  | Cadena ligera                       | Secuencia proteica                  | SEQ ID                            |    |
|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|----|
| 1B1                            | CDR1H1                         |                                     | G Y T F T N Y W                     | 5                                 |    |
|                                | CDR1H2                         |                                     | I D P S D R Y T                     | 6                                 |    |
|                                | CDR1H3                         |                                     | T M Y S F A Y                       | 7                                 |    |
|                                | Dominio variable cadena pesada | CDR1L1                              |                                     | Q S L L D S D G K T Y             | 8  |
|                                |                                | CDR1L2                              |                                     | L V S                             | 9  |
|                                |                                | CDR1L3                              |                                     | V Q G A H L P Q T                 | 10 |
|                                |                                |                                     |                                     | Q V Q L Q Q P G A D L V K P G A S | 11 |
|                                |                                |                                     |                                     | V K L S C K T S G Y T F T N Y W I |    |
|                                |                                |                                     |                                     | Q W I K Q K P G Q G L E W I G E I |    |
|                                |                                |                                     |                                     | D P S D R Y T N Y N Q R F K G K A |    |
|                                |                                |                                     |                                     | T L T V D T S S S T A Y M Q L N S |    |
|                                |                                |                                     |                                     | L T S E D S A V Y Y C T M Y S F A |    |
|                                |                                |                                     | Y W G Q G T L V T V S A             |                                   |    |
| Dominio variable cadena ligera |                                |                                     | D V V M T Q T P L T L S V T I G Q   | 12                                |    |
|                                |                                |                                     | P A S I S C K S S Q S L L D S D G   |                                   |    |
|                                |                                |                                     | K T Y L N W L L Q S P G Q S P K L   |                                   |    |
|                                |                                |                                     | L I Y L V S K L E S G V P D R F S G |                                   |    |
|                                |                                |                                     | S G S G T D F T L K I S R V E A E   |                                   |    |
|                                |                                |                                     | D L G V Y Y C V Q G A H L P Q T F   |                                   |    |
|                                |                                | G S G T K L E I K R                 |                                     |                                   |    |
| 18E1                           | CDR2H1                         |                                     | G D T F T D Y P                     | 13                                |    |
|                                | CDR2H2                         |                                     | I N A E T A E P                     | 14                                |    |
|                                | CDR2H3                         |                                     | A S S Y G Y                         | 15                                |    |
|                                | Dominio variable cadena pesada | CDR2L1                              |                                     | Q S L L Y S D G K T Y             | 16 |
|                                |                                | CDR2L2                              |                                     | L V S                             | 17 |
|                                |                                | CDR2L3                              |                                     | V Q G S H F P H T                 | 18 |
|                                |                                |                                     | Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T   | 19                                |    |
|                                |                                |                                     | V K I S C K A S G D T F T D Y P M   |                                   |    |
|                                |                                |                                     | H W V K Q A P G K G L K W M G W     |                                   |    |
|                                |                                |                                     | I N A E T A E P T Y V D D F K G R   |                                   |    |
|                                |                                | F A F S L E S S A S T A Y L Q I N N |                                     |                                   |    |
|                                |                                | L K N E D T A T Y F C A S S Y G Y   |                                     |                                   |    |
|                                |                                | W G Q G T L V T V S A               |                                     |                                   |    |

ES 2 714 866 T3

|      |        |                                |  |          |    |
|------|--------|--------------------------------|--|----------|----|
|      |        | Dominio variable cadena ligera | DIVMTQTPLTLSVTIGQP<br>ASISCKSSQSLLYSDGK<br>TYLNWLFQSPGQSPKLL<br>IYLVSKLESGVPDRFSG<br>SGSGTDFTLKISRVEAE<br>DLGVYYCVQGSHPHTF<br>GSGTKLEINR               | 20       |    |
| 10B2 | CDR3H1 | Dominio variable cadena pesada | GYTFTDYY   | 21       |    |
|      | CDR3H2 |                                | INPNNGGS   | 22       |    |
|      | CDR3H3 |                                | ARGDYSGTSFVMFAH  | 23       |    |
|      | CDR3L1 |                                | KLLHSNGNTY   | 24       |    |
|      | CDR3L2 |                                | YMS  | 25       |    |
|      | CDR3L3 |                                | MQSLEYPVT  | 26       |    |
|      |        |                                | EVQLQQSGPELVKPGAS<br>VKISCKASGYTFTDYYM<br>NWKQSHGKTLEWIGDI<br>NPNNGGSHYNQKFRGK<br>ATLTIDKSSSTAYMDLRS<br>LTSEDSAVYYCARGDYS<br>GTSFVMFAHWGQGT LVT<br>VSA | 27       |    |
|      |        |                                | DIVMTQAAPSVPTPGE<br>SVSISCRSTKLLHSNG<br>NTYLYWFLQRPQQSPQL<br>LIYYMSNPASGVPDRFS<br>GSGSGTDFTLRISRVGA<br>EDVGIYYCMQSLEYPVT<br>FGAGTKLELKR                | 28       |    |
|      | 15G9   |                                | CDR4H1   | GYTFTDYA | 29 |
|      |        |                                | CDR4H2   | IRTYSGDA | 30 |
|      | CDR4H3 | ATGFNY                         | 31   |          |    |
|      | CDR4L1 | QSLLSNGKTY                     | 32   |          |    |
|      | CDR4L2 | LVS                            | 33   |          |    |

ES 2 714 866 T3

|  |                                |                                |  |    |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--|----|
|  |                                | CDR4L3                         | LQATHFPHT  | 34 |
|  | Dominio variable cadena pesada |                                | QVQLQQSGAELVRPGVS<br>VKISCKGSGYTFTDYAM<br>HWVKQSHAKSLEWIGVI<br>RTYSGDATYNQKFKGKA<br>TMTVDKSSSTAYMELAR<br>LTSEDSAIYYCATGFNY<br>WGQGTTTLTVSS | 35 |
|  |                                | Dominio variable cadena ligera | DVVMTQTPLTSLVTIGQ<br>PASISCKSSQSLLHSNG<br>KTYLNWLLQRPGQSPKL<br>LIYLVSKLESGVPDRFSG<br>SSGGTDFTLKISRVEAE<br>DLGLYYCLQATHFPHTF<br>GSGTKLEIKR  | 36 |

| Anticuerpo |               | Secuencia proteica  | SEQ ID |
|------------|---------------|---|--------|
| 10B2       | Cadena pesada | EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKA<br>SGYTFTDYMNWVKQSHGKTLW<br>IGDINPNNGGSHYNQKFRGKATLTI<br>DKSSSTAYMDLRSLTSEDSAVYYC<br>ARGDYSGTSFVMFAHWGQGLVT<br>VSAAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNS<br>MVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS<br>LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVT<br>VPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKV<br>DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSV<br>FIFPPKPKDVLITITLTPKVTGVVVDI<br>SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT<br>KPREEQINSTFRSVSELPIMHQDW<br>LNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISK<br>TKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDK | 37     |

ES 2 714 866 T3

|     |               |   |    |
|-----|---------------|---|----|
|     |               | VSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQ<br>PAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL<br>NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLH<br>NHHTEKSLSHSPGK   |    |
|     | Cadena ligera | DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCR<br>STKSLLSNGNTYLYWFLQRPQQS<br>PQLLIYYMSNPASGVPDRFSGSGS<br>GTDFTLRISRVAEDVGIYYCMQS<br>LEYPVTFGAGTKLELKRADAAPT<br>SIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFF<br>YPRDINVKWKIDGSRQNGVLNSW<br>TDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYE<br>RHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN<br>NEC   | 38 |
| 1B1 | Cadena pesada | QVQLQQPGADLVKPGASVKLSCKT<br>SGYTFTNYWIQWIKKPGQGLEWI<br>GEIDPSDRYTNYNQRFK GKATLTV<br>DTSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYC<br>TMYSFAYWGQGLVTVSAAKTPP<br>SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVK<br>GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFP<br>AVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQ<br>TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDC<br>GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV<br>LTITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQF<br>SWFVDDVEVHTAQTKPREEQINST<br>FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV<br>NSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQV<br>YTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNFF<br>PEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI<br>MDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAG<br>NTFTCSVLHEGLHNHHTEKSLSHS<br>PGK | 39 |
|     | Cadena        | DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKS   | 40 |



|      |               |  |    |
|------|---------------|--|----|
|      | ligera        | SQSLLDSDGKTYLNWLLQSPGQSP<br>KLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSG<br>TDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGA<br>HLPQTFGSGTKLEIKRADAAPT VSI<br>FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP<br>RDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTD<br>QDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH<br>NSYTCEATHKTSTSPIVKSFN RNE<br>C   |    |
| 18E1 | Cadena pesada | QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKA<br>SGDTFTDYPMHVVKQAPGKGLKW<br>MGWINAETA EPTYVDDFKGRFAFS<br>LESSASTAYLQINNLK NEDTATYFC<br>ASSYGYWGQGT LVTVSAAKTTAPS<br>VYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKG<br>YFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPA<br>VLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS<br>ITCNVAHPASSTKVDK KIEPRGPTI<br>KPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPP<br>KIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDD<br>PDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHRE<br>DYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKE<br>FKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSV<br>RAPQVYVLP PPEEEMTKKQVTLTC<br>MVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNY<br>KNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKK<br>NWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTT<br>KSFSRTPGK | 41 |
|      | Cadena ligera | DIVMTQTPLT LSVTIGQPASISCKS<br>SQSLLYSDGKTYLNWLFQSPGQSP<br>KLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSG<br>TDFTLKISRVEAEDLGVYYCVQGS<br>HFPHTFGSGTKLEINRADAAPT VSI<br>FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP<br>RDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTD   | 42 |

|      |               |  |    |
|------|---------------|--|----|
|      |               | QDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERH<br>NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNE<br>C  |    |
| 15G9 | Cadena pesada | QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKG<br>SGYTFTDYAMHWVKQSHAKSLEWI<br>GVIRTYSGDATYNQKFKGKATMTV<br>DKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYC<br>ATGFNYWGQGTTTLTVSSAKTTPPS<br>VYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKG<br>YFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPA<br>LLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQT<br>VTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPI<br>STINPCPPCKECKCPAPNLEGGP<br>SVFIFPPNIKDVLMLSLTPKVTCVV<br>VDVSEDDPDVQISWVNNVEVHTA<br>QTQTHREDYNSTIRVVSTLPIQHQ<br>DWMSGKEFKCKVNNKDLPSPIERT<br>ISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSR<br>KDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSN<br>GHTEENYKDTAPVLDSDGSYFIYS<br>KLNMKTSKWEKTDSFSCNVRHEG<br>LKNYYLKKTISRSPGK | 43 |
|      | Cadena ligera | DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKS<br>SQSLLHSNGKTYLNWLLQRPGQSP<br>KLLIYLVSKLESGVPDRFSGSGSG<br>TDFTLKISRVEAEDLGLYYCLQATH<br>FPHTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIF<br>PPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPR<br>DINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQ<br>DSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHN<br>SYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC  | 44 |

La presente descripción también se refiere a un ácido nucleico seleccionado entre:

- a. ADN o ARN que codifica un anticuerpo, o un fragmento funcional, según la presente descripción o ADN que codifica una cadena pesada o una cadena ligera de un anticuerpo según la presente descripción,
- 5 b. Secuencia de ADN que comprende la SEQ ID 45, SEQ ID 46, SEQ ID 47, SEQ ID 48, SEQ ID 49, SEQ ID 50, SEQ ID 51, SEQ ID 52, SEQ ID 53, SEQ ID 54, SEQ ID 55, SEQ ID 56, SEQ ID 57, SEQ ID 58, SEQ ID 59, SEQ ID 60, SEQ ID 61, SEQ ID 62, SEQ ID 63, SEQ ID 64, SEQ ID 65, SEQ ID 66, SEQ ID 67, SEQ ID 68, SEQ ID 69, SEQ ID 70, SEQ ID 71, SEQ ID 72, SEQ ID 73, SEQ ID 74, SEQ ID 75, SEQ ID 76.
- c. Secuencia de ARN transcrita a partir de una secuencia de ADN anterior.

10 La presente descripción se refiere también a un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la descripción. La descripción se refiere también en particular a un vector que comprende un ADN que codifica una cadena pesada de un anticuerpo según la presente descripción y un ADN que codifica una cadena ligera de un anticuerpo según la presente descripción.

En un modo de realización, la presente descripción se dirige a una célula hospedante que contiene un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico según la presente descripción.

15 Los vectores según la presente descripción contienen elementos que permiten la expresión de las secuencias nucleicas en la célula hospedante.

El término vector usado en la presente memoria se refiere a una secuencia de ácido nucleico capaz de transportar otra secuencia de ácido nucleico a la que se ha unido/enlazado. Por ejemplo, puede ser un plásmido o vectores virales.

20 Tabla 3 Secuencias SEQ ID N° de las secuencias nucleotídicas de los componentes de los anticuerpos según la descripción

| Anticuerpo | Cadena pesada | Cadena ligera | Secuencia nucleotídica            | SEQ ID N° |
|------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------|
| 1B1        | CDR1H1        |               | GGCTACACCTTCACCAACTACTGG          | 45        |
|            | CDR1H2        |               | ATTGATCCTTCTGATAGATATACT          | 46        |
|            | CDR1H3        |               | ACAATGTATTCGTTTGCTTAC             | 47        |
|            |               | CDR1L1        | CAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAAACCTAT | 48        |
|            |               | CDR1L2        | CTGGTGTCT                         | 49        |
|            |               | CDR1L3        | GTGCAAGGTGCACATCTCCCTCAAACG       | 50        |

ES 2 714 866 T3

|  |                                |                                |   |    |
|--|--------------------------------|--------------------------------|---|----|
|  | Dominio variable cadena pesada |                                | CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGGCTG<br>ACCTTGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAA<br>GCTCTCCTGCAAGACCTCTGGCTACACCT<br>TCACCAACTACTGGATACAGTGGATAAAA<br>CAGAAGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGA<br>TCGGAGAGATTGATCCTTCTGATAGATAT<br>ACTAATTACAATCAAAGATTCAAGGGCAA<br>GGCCACATTGACTGTAGACACATCCTCCA<br>GCACAGCCTACATGCAGCTCAACAGCCTA<br>ACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTG<br>TACAATGTATTGTTTTGCTTACTGGGGCC<br>AAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA | 51 |
|  |                                | Dominio variable cadena ligera | GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCAC<br>TTTGTCTGTTACCATTGGACAGCCAGCTT<br>CCATTTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTC<br>TTAGATAGTGATGGAAAAACCTATTTGAAT<br>TGTTATTACAGAGTCCAGGGCCAGTCTCC<br>AAAGCTCTTAATCTATCTGGTGTCTAAGCT<br>GGAATCTGGAGTCCCTGACAGATTCAGTG<br>GCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTG<br>AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTT<br>GGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGGTGCAC<br>ATCTCCCTCAAACGTTTCGGATCGGGGAC<br>CAAACCTGGAATAAAAACGG   | 52 |

| Anticuerpo | Cadena pesada | Cadena ligera                  | Secuencia nucleotídica                | SEQ N°  |
|------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| 18E1       | CDR1H1        |                                | GGTGACACCTTCACAGACTATCCA              | 53  |
|            | CDR1H2        |                                | ATAAACGCTGAGACTGCTGAGCCA              | 54  |
|            | CDR1H3        |                                | GCTAGTTCCTATGGTTAC                    | 55  |
|            |               | CDR1L1                         | CAGAGCCTCTTATATAGTGATGGAAAAAC<br>CTAT | 56  |
|            |               | CDR1L2                         | CTGGTGTCT                             | 57  |
|            |               | CDR1L3                         | GTGCAAGGTTACATTTCCCTCATACG            | 58  |
|            |               | Dominio variable cadena pesada |                                       | CAGATCCAGTTGGTGCAGTCTGGACCTG<br>AGCTGAAGAAGCCTGGAGAGACAGTCAA<br>GATCTCCTGCAAGGCTTCTGGTGCACCT<br>TCACAGACTATCCAATGCACTGGGTGAAG<br>CAGGCTCCAGGAAAGGGTTTAAAGTGGA<br>TGGGCTGGATAAACGCTGAGACTGCTGA<br>GCCAACATATGTAGACGACTTCAAGGGAC<br>GGTTTGCCTTCTCTTTGGAATCCTCTGCC<br>AGCACTGCCTATTTGCAGATCAACAACCT<br>CAAAAATGAGGACACGGCTACATATTTCT<br>GTGCTAGTTCCTATGGTACTGGGGCCAA |

|  |  |                                |   |    |
|--|--|--------------------------------|---|----|
|  |  |                                | GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA  |    |
|  |  | Dominio variable cadena ligera | GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCAC<br>TTTGTCTGTTACCATTGGACAGCCAGCTT<br>CCATTTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTC<br>TTATATAGTGATGGAAAAACCTATTTGAAT<br>TGGTTATTCCAGAGTCCAGGCCAGTCTCC<br>AAAGCTCTTAATCTATCTGGTGTCTAACT<br>GGAATCTGGAGTCCCTGACAGATTCAGTG<br>GCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACACTG<br>AAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTT<br>GGGAGTTTATTACTGCGTGCAAGTTTCAC<br>ATTTCCCTCATACGTTCCGGATCGGGGACC<br>AAGCTGGAAATAAACCGG | 60 |

| Anticuerpo | Cadena pesada | Cadena ligera                  | Secuencia nucleotídica                | SEQ ID N°   |
|------------|---------------|--------------------------------|---------------------------------------|---|
| 15G9       | CDR1H1        |                                | GGCTACACATTCACTGATTATGCT              | 61  |
|            | CDR1H2        |                                | ATTCGTACTTACTCTGGTGATGCT              | 62  |
|            | CDR1H3        |                                | GCAACCGGGTTTAACTAC                    | 63  |
|            |               | CDR1L1                         | CAGAGCCTCTTACATAGTAATGGAAAGAC<br>ATAT | 64  |
|            |               | CDR1L2                         | CTGGTGTCT                             | 65  |
|            |               | CDR1L3                         | TTGCAAGCTACACATTTTCCTCATACG           | 66  |
|            |               | Dominio variable cadena pesada |                                       | CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTG<br>AGCTGGTGAGGCCTGGGGTCTCAGTGAA<br>GATTTCTGCAAGGGTTCTGGCTACACAT<br>TCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAAG<br>CAGAGTCATGCAAAGAGTCTAGAGTGGAT<br>TGGAGTTATTCGTACTTACTCTGGTGATG<br>CTACCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAG<br>GCCACAATGACTGTAGACAAATCCTCCAG<br>CACAGCCTATATGGAACCTTGCCAGACTGA<br>CATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGT<br>GCAACCGGGTTTAACTACTGGGGCCAAG<br>GCACCACTCTCACAGTCTCCTCA |

ES 2 714 866 T3

|  |  |                                |   |    |
|--|--|--------------------------------|---|----|
|  |  | Dominio variable cadena ligera | GATGTTGTGATGACTCAGACCCCACTCAC<br>TTTGTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCT<br>CCATCTCTTGCAAATCAAGTCAGAGCCTC<br>TTACATAGTAATGGAAAGACATATTTGAAT<br>TGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCC<br>AAAGCTCTTAATCTATCTGGTGTCTAACT<br>GGAATCTGGAGTCCCTGACAGGTTTCAGT<br>GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACAC<br>TGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGA<br>TTTGGGACTTTATTACTGCTTGCAAGCTA<br>CACATTTTCCTCATACGTTCCGGATCGGGG<br>ACCAAGCTGGAAATAAAACGG | 68 |
|--|--|--------------------------------|---|----|

| Anticuerpo | Cadena pesada                  | Cadena ligera   | Secuencia nucleotídica   | SEQ ID N° |
|------------|--------------------------------|---|--|-----------|
| 10B2       | CDR1H1                         |   | GGATACACGTTCACTGATTACTAC   | 69        |
|            | CDR1H2                         |   | ATTAATCCTAATAATGGTGGTAGT   | 70        |
|            | CDR1H3                         |   | GCAAGAGGCGATTACTCCGGTACTAGTTT<br>CGTTATGTTTGCTCAC  | 71        |
|            |                                | CDR1L1  | AAGAGTCTTCTGCACAGTAATGGCAACAC<br>TTAC  | 72        |
|            |                                | CDR1L2  | TATATGTCC  | 73        |
|            |                                | CDR1L3  | ATGCAAAGTCTAGAATATCCTGTCACG  | 74        |
|            | Dominio variable cadena pesada |   | GAGGTCCAGCTGCAACAATCTGGACCTG<br>AGCTGGTGAAGCCTGGGGCCTCAGTTAA<br>GATTCCTGTAAGGCTTCTGGATACACGT<br>TCACTGATTACTACATGAACTGGGTGAAG<br>CAGAGCCATGGAAAGACCCTTGAGTGGA<br>TTGGAGATATTAATCCTAATAATGGTGGTA<br>GTCACTACAACCAGAAGTTCAGGGGGCAA<br>GGCCACATTGACTATAGACAAGTCCTCCA<br>GTACAGCCTACATGGACCTCCGCAGCCT<br>GACATCTGAAGACTCTGCAGTCTATTACT<br>GTGCAAGAGGCGATTACTCCGGTACTAGT<br>TTCGTTATGTTTGCTCACTGGGGCCAAGG<br>GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA | 75        |
|            | Dominio variable cadena ligera | GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTC<br>TGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTAT<br>CCATCTCCTGCAGGTCTACTAAGAGTCTT<br>CTGCACAGTAATGGCAACACTTACTTGTA<br>TTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCT<br>CCTCAACTCCTGATATATTATATGTCCAAC<br>CCTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCA<br>GTGGCAGTGGGTCAGGAACTGATTTAC | 76   |           |

|  |  |  |   |  |
|--|--|--|---|--|
|  |  |  | ACTGAGGATCAGTCGAGTGGGGGCTGAG<br>GATGTAGGTATTTATTACTGTATGCAAAGT<br>CTAGAATATCCTGTACGTTCCGGTGCGGG<br>GACCAAGCTGGAGCTGAAACGG |  |
|--|--|--|---|--|

5 La presente descripción se refiere también a una célula hospedante transformada/transfectada/transducida por un vector según la descripción o que comprende dicho vector. La célula hospedante según la descripción puede ser una célula procariota o eucariota, por ejemplo, una bacteria, una levadura, una célula animal, en particular una célula de mamífero.

Otro aspecto de la presente descripción comprende un método para producir un anticuerpo según la descripción, o un fragmento funcional que tiene propiedades de unión antigénicas, caracterizado por que este método comprende las siguientes etapas:

- cultivar una célula hospedante según la descripción en un medio adecuado y en condiciones apropiadas,
- 10 - recuperar el anticuerpo o un fragmento funcional que tiene propiedades de unión antigénicas.

La recuperación se podrá realizar por cualquier medio de purificación convencional conocido por los expertos en la técnica, tal como por ejemplo cromatografía.

15 Los anticuerpos según la presente descripción tienen la propiedad particular de poder unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta en forma completa, y no solo una forma trunca y esto por transferencia de Western o en su entorno celular, más particularmente en el seno de un corte histológico de tejido y revelada por inmunohistoquímica en particular. En un modo de realización de la presente descripción, el anticuerpo monoclonal según la descripción se caracteriza así por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Zeta en el seno de células o cortes histológicos de tejidos.

20 En un modo de realización particular de la presente descripción, los anticuerpos monoclonales según la descripción se caracterizan por su capacidad para unirse al dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta y permitir la detección de la ADN polimerasa Pol Zeta por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia, preferentemente por inmunohistoquímica.

25 La presente descripción se refiere a anticuerpos, tales como los descritos anteriormente para su uso *in vitro* o *ex vivo* con fines de diagnóstico y/o pronóstico de un trastorno patológico hiperproliferante asociado a la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta. Más particularmente, la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta es una expresión anómala. Más particularmente incluso, la expresión anómala de la ADN polimerasa Pol Zeta es una sobre-expresión.

En un modo de realización particular, el trastorno patológico hiperproliferante es un cáncer.

La presente descripción se refiere a un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* la presencia de un tumor que sobre-expresa la ADN polimerasa Pol Zeta en un sujeto, que comprende las etapas siguientes:

- 30 a. poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con un anticuerpo según la presente descripción,
- b. detectar la unión del anticuerpo a la ADN polimerasa Pol Zeta ADN en el seno de la muestra.

35 La expresión «diagnóstico» se entiende en el contexto de la presente descripción que define un procedimiento para identificar o detectar la presencia de un trastorno patológico hiperproliferante, en particular un cáncer, asociado a la expresión, o provocado por ella, en particular, la expresión anómala, incluso más particularmente la sobre-expresión, de la ADN polimerasa Pol Zeta.

La noción de diagnóstico abarca la noción de vigilancia de la progresión de la enfermedad, así como la identificación de células, tejidos o muestras indicadoras de un trastorno asociado por la expresión, o provocado por ella, en particular la expresión anómala, más particularmente incluso la sobre-expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta.

40 La noción de pronóstico se entiende en el contexto de la presente descripción como la probabilidad o la predicción o la predisposición al desarrollo de una enfermedad de tipo trastorno patológico hiperproliferante, en particular un cáncer. Esta noción de pronóstico incluye también el pronóstico sobre el resultado de dicha enfermedad.

En particular, si una muestra obtenida de un sujeto es negativa en base al revelado con un anticuerpo según la presente descripción, entonces el pronóstico para ese sujeto es mejor que si la muestra es positiva.

45 Las muestras obtenidas de un sujeto se pueden evaluar para determinar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una escala, tal como se describe a continuación.

Tal como se indicó anteriormente, los anticuerpos según la presente descripción pueden estar en forma de inmunoconjugado o anticuerpo marcado para obtener una señal detectable y/o cuantificable.

5 Cuando se usan - marcados o conjugados - con cualquier otro reactivo detectable adecuado, los anticuerpos según la presente descripción son particularmente adecuados para aplicaciones de diagnóstico o pronóstico. *in vitro* o *ex vivo*, utilizando técnicas de inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

En el contexto de la presente descripción, la expresión «trastorno patológico hiperproliferante asociado a la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta» se refiere a una enfermedad para la que ha sido puesta de manifiesto la presencia de niveles altos, o niveles anómalos de la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en un sujeto que padece dicha enfermedad.

10 Dichos trastornos pueden por tanto ser puestos de manifiesto por un aumento del nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta por el uso de anticuerpos según la presente descripción.

Por lo tanto, un objeto de la presente descripción es proporcionar un método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en un sujeto que comprende las etapas siguientes:

- a. poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con un anticuerpo según la presente descripción,
- 15 b. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en el seno de la muestra.

En el contexto de la presente descripción, se evalúa el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta por medio de la unión de los anticuerpos a la proteína. Cuanta más proteína esté presente, más enlaces detectables habrá y será importante más intensidad de la señal.

20 Incluso un objeto de la presente descripción es proporcionar un método para evaluar *in vitro* o *ex vivo* la gravedad o agresividad de un tumor o cáncer en un sujeto, que comprende las etapas siguientes:

- a. poner en contacto una muestra biológica de tumor obtenida del sujeto con un anticuerpo según la presente descripción,
- b. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en el seno de la muestra,
- c. evaluar el tumor o el cáncer comparando el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una escala.

25 Según la presente descripción, el término «agresividad» de un cáncer o de un tumor se entiende como la propensión de este cáncer o de este tumor a invadir los tejidos vecinos y generar metástasis, así como la rapidez con que se manifiestan estas invasiones.

La agresividad está relacionada, por supuesto, con la tasa de supervivencia y el método según la descripción puede también servir como pronóstico de supervivencia del paciente.

30 En tal caso, un diagnóstico de agresividad significa un mal pronóstico de supervivencia y la ausencia de agresividad significa un buen pronóstico de supervivencia.

Se evalúa un diagnóstico de agresividad o ausencia de agresividad mediante una escala comparando el nivel de expresión de ADN polimerasa Pol Zeta en el seno de la muestra con relación a los controles positivos o negativos.

35 En particular, según la presente descripción, la detección en el seno de la muestra se realiza por inmunohistoquímica.

Un objeto de la presente descripción es proporcionar un método, tal como el descrito anteriormente, en el que la detección de la unión del anticuerpo o la cuantificación del nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en el seno de la muestra se realiza por inmunohistoquímica.

40 En otra forma de realización, la descripción se refiere a un método para detectar células cancerosas que presentan inestabilidad genética. La expresión desregulada de la ADN polimerasa Pol Zeta conduce a un aumento de los daños del ADN y a una inestabilidad cromosómica, lo que desencadena la activación constitutiva del «*[gamma]H2AX-ATM-CHK2 DNA damage checkpoint*».

El término "inestabilidad genética" de un cáncer significa la propensión de las células tumorales del cáncer a sufrir daños en el ADN.

45 Por el término "daños en el ADN" se entiende una o más modificaciones del ADN que afectan el funcionamiento normal del ADN causando la creación de enlaces covalentes o modificando los enlaces covalentes y que dan como resultado uno o más cambios en la conformación normal de la doble hélice del ADN. Tales cambios, implican a su vez distorsiones estructurales que interfieren con la replicación y la transcripción. Generalmente, cuando una célula es dañada en el ADN, el ciclo celular se detiene, lo que puede conducir a la activación de un proceso de reparación del ADN (en caso de un daño menor) o apoptosis (en caso un daño mayor).

50



Los daños en el ADN pueden ocurrir espontáneamente o ser inducidos por factores ambientales, tales como radiaciones (rayos X, UV, rayos gamma o radioterapia), toxinas (por ejemplo, toxinas de plantas o toxinas de síntesis), pero también por fármacos, tales como las quimioterapias anticancerosas.

5 Por lo tanto, la presente descripción proporciona un método para diagnosticar la inestabilidad del cáncer en un sujeto a partir de una muestra cancerosa de dicho sujeto, que comprende:

- a. poner en contacto un anticuerpo según la descripción con una muestra cancerosa obtenida del sujeto,
- b. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en la muestra analizada,
- c. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una muestra sana del mismo sujeto,
- d. medir la relación entre el nivel de expresión obtenido en la etapa b y el nivel obtenido en la etapa c,

10 en el que la relación proporciona información sobre la inestabilidad genética del cáncer.

En un modo de realización particular, una relación mayor que 1 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado, de inestabilidad genética del cáncer. Por el contrario, una relación menor o igual a 1 indica un riesgo bajo o ningún riesgo de inestabilidad genética del cáncer.

15 En un modo de realización particular, el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta se evalúa por inmunohistoquímica según la escala ALLRED.

En un modo de realización particular, una relación mayor que 1,5 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado, de inestabilidad genética del cáncer. Por el contrario, una relación menor o igual a 1,5 indica un riesgo bajo o ningún riesgo de inestabilidad genética del cáncer.

20 En otro modo de realización particular, una relación mayor que 2 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado, de inestabilidad genética del cáncer. Por el contrario, una relación menor o igual a 2 indica un riesgo bajo o ningún riesgo de inestabilidad genética del cáncer.

El término «muestra sana» en el presente documento se refiere, en el contexto de la presente descripción, a una muestra no cancerosa.

25 Preferiblemente, la cuantificación del nivel de unión del anticuerpo a la ADN polimerasa Pol Zeta y/o el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta se lleva a cabo por medio de la escala apropiada, tal como, por ejemplo, la escala ALLRED.

En una forma de realización particular de la descripción, la escala apropiada, por ejemplo, la escala ALLRED, se basa en dos parámetros que son la intensidad de la coloración y el porcentaje de células positivas.

30 En una manera de realización, incluso más preferentemente, la escala apropiada, tal como la escala ALLRED, es una escala de 0 a 8 en la que la «sin reactividad» se evalúa en el nivel 0, y una fuerte reactividad en una proporción de «67 a 100% reactiva» se evalúa en el nivel 8.

35 Una vez cuantificado el nivel de unión del anticuerpo a la ADN polimerasa Pol Zeta, que refleja la cantidad de la ADN Polimerasa Pol Zeta presente en la muestra y, por tanto, el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en la muestra, el resultado se puede comparar con el obtenido de una muestra de control, normal, obtenida, preparada y tratada de la misma manera, pero de un sujeto que no presenta un trastorno patológico hiperproliferante, tal como el cáncer. En un modo de realización particular, la muestra de control - preparada y tratada de la misma manera - se obtiene del mismo sujeto y proviene de un tejido no canceroso del mismo sujeto. Dicha muestra de control se considera un control negativo y su puntuación en la escala ALLRED sería cero o próxima a cero.

40 Si el nivel medido es significativamente más alto en la muestra analizada en comparación con la muestra de control, se puede concluir que el sujeto tiene un mal pronóstico de supervivencia o que la muestra cancerosa es genéticamente inestable.

Un nivel significativamente más alto corresponde, por ejemplo, al nivel 3 y superior en la escala ALLRED, especialmente en el nivel 5 y superior en la escala ALLRED.

45 Con respecto al desarrollo de la terapia contra el cáncer dirigida, el diagnóstico por métodos inmunohistoquímicos según la descripción proporciona informaciones cruciales sobre el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta y permite la selección del paciente, o determinar la elegibilidad del paciente, para un tratamiento de quimioterapia, particularmente un tratamiento de quimioterapia adyuvante o un tratamiento de radioterapia.

50 De hecho, la capacidad de pronóstico y predicción de la evolución de un cáncer según los métodos de la presente descripción que está asociada con la determinación de la agresividad de dicho cáncer es crucial para la selección del tratamiento adecuado, sabiendo que los tratamientos pesados y costosos con efectos secundarios graves,

además de los tratamientos quirúrgicos, no deben usarse más que cuando sean necesarios y solamente cuando sean necesarios.

La presente descripción se refiere, por lo tanto, a un método para seleccionar un tratamiento adecuado para el cáncer en un paciente que haya sido sometido a un tratamiento quirúrgico, que comprende:

- 5       - diagnosticar la agresividad o no agresividad del cáncer en el paciente utilizando el método según la descripción y
- añadir un tratamiento de quimioterapia o radioterapia al tratamiento quirúrgico si dicho cáncer es diagnosticado como agresivo.

10       La evaluación de la agresividad o de la gravedad de un cáncer según un método, tal como se describe anteriormente se puede llevar a cabo comparando el nivel cuantificado de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una escala. Especialmente puede ser, por ejemplo, la escala ALLRED.

En una forma aún más simplificada, esta evaluación se puede clasificar también como negativa o positiva por un examen visual de las muestras de inmunohistoquímica por un especialista en anatomía patológica.

15       Se puede realizar un enfoque más objetivo y cuantitativo para la evaluación del nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta por la medición de dos parámetros que son la proporción de células coloreadas y la intensidad de dicha coloración (es decir, positivas) en el seno de la muestra analizada.

20       En un modo de realización particular de un método según la descripción, la cuantificación del nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta se lleva a cabo según la escala ALLRED. Esta escala se basa en la combinación de dos parámetros: la intensidad de la coloración y el porcentaje de células coloreadas (Harvey et al.; *J Clin. Oncol.* 1999; 17; 1474-1481).

La Tabla 4 ilustra el uso de los resultados de la inmunohistoquímica según la escala ALLRED.

Tabla 4: Evaluación de las puntuaciones de los resultados de inmunohistoquímica según la escala ALLRED.

| Intensidad de la reacción                         | Puntuación 1   | Proporción de células reactivas | Puntuación 2 |
|---|----------------|---------------------------------|--------------|
| Ninguna reactividad                               | 0              | Ninguna                         | 0            |
| Reactividad débil                                 | 1              | 0-1%                            | 1            |
| Reactividad moderada                              | 2              | 1-10%                           | 2            |
| Reactividad fuerte                                | 3              | 11-33%                          | 3            |
|   |                | 34-67%                          | 4            |
|   |                | 67-100%                         | 5            |
|   |                |                                 |              |
| Puntuación total<br>(Puntuación 1 + Puntuación 2) | Interpretación |                                 |              |
| 0-2   | Negativa       |                                 |              |
| 3-8   | Positiva       |                                 |              |

25       Así, en un método según la presente descripción, por ejemplo, una puntuación total comprendida entre 0 y 2 se podrá entender como negativa con respecto a la agresividad del cáncer, y una puntuación comprendida entre 3 y 8 se podrá considerar como positiva con respecto a la agresividad del cáncer.

Otro objeto de la presente descripción es proporcionar un método para evaluar el estado de un tumor en un sujeto, *in vitro* o *ex vivo*, que comprende las etapas:

- 30       - poner en contacto una muestra de tumor, obtenida del sujeto con un anticuerpo según la presente descripción, por inmunohistoquímica
- medir la puntuación del tumor en la escala ALLRED entre 0 y 8

- determinar si el tumor tiene un estado POLQ(-) (o Pol Zeta -) si la puntuación está comprendida entre 0 y 2,
- determinar si el tumor tiene un estado POLQ(+) (o Pol Zeta +) si la puntuación está comprendida entre 3 y 8.

En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 3.

En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 4.

5 En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 5.

En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 6.

En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 7.

En un aspecto particular, se determina que el tumor tiene un estado POLQ(+) si la puntuación es 8.

10 La expresión POLQ(+) (o Pol Zeta +) significa que la muestra evaluada presenta una expresión anómala de la ADN polimerasa Pol Zeta, más particularmente una sobre-expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta.

La expresión POLQ(-) (o Pol Zeta -) significa que la muestra evaluada no presenta una expresión anómala de la ADN polimerasa Pol Zeta, más particularmente no presenta una sobre-expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta.

15 El ensayo ALLRED presentado en esta memoria representa un método de cuantificación entre otros, y un experto en la técnica no se limitará a evaluar la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en la muestra analizada y podrá ser considerado cualquier otro método que llegue a la conclusión que la expresión es anómala, en particular la sobre-expresión de esta proteína.

La presente descripción proporciona también un método de evaluación del riesgo de desarrollo o progresión de un cáncer en un paciente, comprendiendo dicho método la medición del nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una muestra biológica obtenida del paciente.

20 Por lo tanto, la descripción se refiere a un método de evaluación del riesgo de desarrollo o progresión de un cáncer en un sujeto, que comprende las etapas de:

- a. poner en contacto un anticuerpo según la descripción con una muestra cancerosa obtenida del sujeto,
- b. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en la muestra analizada,
- c. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en una muestra equivalente del mismo sujeto  
25 en un momento posterior,
- d. medir la relación entre el nivel de expresión obtenido en la etapa b y el nivel obtenido en la etapa c,

en el que la relación proporciona una información sobre el riesgo de desarrollo o progresión del cáncer.

30 En un modo de realización particular, una relación menor que 1 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado, de desarrollo o progresión de un cáncer. Por el contrario, una relación mayor o igual a 1 indica un riesgo bajo o ausencia de riesgo de desarrollo o progresión de un cáncer.

En un modo de realización más particular, una relación menor que 1,5 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado, de desarrollo o progresión de un cáncer. Por el contrario, una relación mayor o igual a 1,5 indica un riesgo bajo o una ausencia de riesgo de desarrollo o progresión de un cáncer.

35 En un modo de realización más particular, una relación menor que 2 indica un riesgo, o un riesgo acrecentado de desarrollo o progresión de un cáncer. Por el contrario, una relación mayor o igual a 2 indica un riesgo bajo o una ausencia de riesgo de desarrollo o progresión de un cáncer.

En un modo particular, el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta se evalúa por inmunohistoquímica según la escala ALLRED.

40 En el contexto de la descripción, por el término «muestra cancerosa», se hace referencia en la presente memoria a una muestra de tejido tumoral. La muestra cancerosa, o muestra de cáncer, puede ser una muestra de cáncer sólido procedente de una biopsia o de una terapia de resección quirúrgica.

La muestra de cáncer sólido es una muestra que contiene células cancerosas y se puede preparar según técnicas histológicas usuales conocidas por los expertos en la técnica para preparar esta muestra para su evaluación, por ejemplo, por inmunohistoquímica o por inmunofluorescencia.

45 En el contexto de la presente descripción, el término cáncer significa un estado fisiológico caracterizado por una hiperproliferación celular, más particularmente una hiperproliferación patológica.

5 Los términos "cáncer" o "canceroso" corresponden en la presente memoria a todos los estadios de la enfermedad. Ventajosamente, el cáncer es un cáncer en un estadio precoz o moderadamente avanzado. Por los términos «precoz» o «moderadamente avanzado» se entiende en la presente memoria un cáncer cuyo estadio está comprendido entre el estadio IA y el estadio IIIA. En un modo de realización preferido de la presente descripción, el cáncer es un cáncer en un estadio precoz.

10 Más particularmente, un cáncer según la presente descripción se puede seleccionar de cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma de pulmón, cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de hígado, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de cerebro, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de endometrio, cáncer de glándulas salivales, cáncer de tiroides, hepatocarcinoma, melanomas, melanomas nodulares, linfoma, linfoma no Hodgkin (NHL), leucemias, leucemias linfoblásticas, leucemias mieloblásticas, trastornos mieloproliferantes y trastornos linfoproliferantes postrasplante.

En particular, el cáncer se selecciona de cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

15 Preferiblemente, el cáncer es cáncer de mama.

Preferiblemente, el cáncer es cáncer de colon.

Preferiblemente, el cáncer es cáncer de pulmón.

20 En los métodos según la descripción, el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta se puede comparar o medir ventajosamente en relación con los niveles de expresión en una muestra de referencia o muestra de control que corresponde a una muestra no patológica, es decir, no cancerosa. Esta muestra de control o de referencia puede provenir del mismo paciente y en este caso dicha muestra de control no es cancerosa. Esta muestra también puede provenir de otro paciente que no padezca cáncer.

El nivel de expresión en la muestra de control se evalúa utilizando la misma técnica y la misma metodología que la muestra cancerosa.

25 Los hibridomas capaces de producir los anticuerpos según la descripción se han depositado en la CNCM, Institut Pasteur, París, Francia, bajo los siguientes números y días:

El hibridoma 1B1-3D4-2C5 capaz de producir el anticuerpo 1B1 se depositó con el número CNCM I-4824, el 3 de diciembre de 2013.

30 El hibridoma 18E1-3E12 capaz de producir el anticuerpo 18E1 se depositó con el número CNCM I-4827, el 3 de diciembre de 2013.

El hibridoma 10B2-3B10-3D1 capaz de producir el anticuerpo 10B2 se depositó con el número CNCM I-4825, el 3 de diciembre de 2013.

El hibridoma 15G9-3D5 capaz de producir el anticuerpo 15G9 se depositó con el número CNCM I-4826, el 3 de diciembre de 2013.

35 El anticuerpo monoclonal, designado en la presente memoria 1B1, o sus derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por que es secretado por el hibridoma 1B1-3D4-2C5, CNCM I-4824.

El anticuerpo monoclonal, designado en la presente memoria 18E1, o sus derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por que es secretado por el hibridoma 18E1-3E12, CNCM I-4827.

40 El anticuerpo monoclonal, designado en la presente memoria 10B2, o sus derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por que es secretado por el hibridoma 10B2-3B10-3D1, CNCM I-4825.

El anticuerpo monoclonal, designado en la presente memoria 15G9, o sus derivados o fragmentos funcionales, se caracteriza por que es secretado por el hibridoma 15G9-3D5, CNCM I-4826.

45 Otro objeto de la presente descripción comprende un kit, es decir, un conjunto de reactivos envasados en cantidades predeterminadas con instrucciones de uso para realizar ensayos de diagnóstico y/o de pronóstico según los métodos de la presente descripción.

Un kit según la descripción puede comprender al menos un anticuerpo según la presente descripción para la detección y/o cuantificación de la expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta *in vitro* o *ex vivo*. Preferiblemente, el kit está destinado para uso en inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

50 En un modo particular de realización particular de la descripción, un anticuerpo según la descripción está marcado, por ejemplo, por una enzima y el kit puede comprender los sustratos y cofactores necesarios.

Según otro aspecto de la realización de la descripción, los anticuerpos según la presente descripción, o sus fragmentos funcionales, tales como los descritos anteriormente, se marcan con una parte detectable para ser preparados y comercializados en forma de kit para la identificación y/o para el diagnóstico de tejidos o células según uno de los métodos de acuerdo con la presente descripción aquí descrita.

- 5 Los ejemplos no limitativos de tales marcadores incluyen fluoróforos, tales como isotiocianato de fluoresceína; cromóforos, radionucleótidos, biotina o enzimas.

Los anticuerpos según la descripción, así marcados se pueden usar para ensayos de localización histológica de ADN polimerasa Pol Zeta en muestras de tejido, particularmente por inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

- 10 En una forma particular de la descripción, el kit según la descripción comprende un reactivo para detectar la unión del anticuerpo a la ADN polimerasa Pol Zeta.

En otro modo de realización de la descripción, el kit comprende un reactivo para cuantificar el nivel de unión del anticuerpo como se describe con la ADN polimerasa Pol Zeta.

En otra forma de realización de la descripción, el kit comprende además un anticuerpo monoclonal o policlonal que reconoce los anticuerpos de muridos. Ventajosamente, este anticuerpo monoclonal o policlonal está marcado.

- 15 Los siguientes ejemplos sirven para ilustrar los diferentes aspectos de la descripción.

**Ejemplo 1: Péptidos antigénicos y producción de anticuerpos según la descripción**

Los tres siguientes péptidos se usaron para inmunizar ratones OF1 con el fin de producir los anticuerpos según la descripción.

| Péptidos  | Secuencia de aminoácidos | SEQ ID Nº |
|-----------|--------------------------|-----------|
| Péptido 1 | CKHSPNIVQDLNKSREHTSS     | 1         |
| Péptido 2 | CSIFRARKRASLDINKEKPG     | 2         |
| Péptido 3 | CLQEDLIKSNVNENQDTH       | 3         |
| Péptido 4 | HDETSSLLPRKESNIVDDNGC    | 4         |

- 20 Los péptidos se acoplan a la KLH (para fines de inmunización) y a la BSA (para cribado de hibridomas). Se inmunizan 3 ratones con la mezcla KLH-péptidos 1 + 2 y se inmunizan 3 ratones con la mezcla KLH-péptido 4. Los sueros se toman y se analizan para determinar el reconocimiento de péptidos libres por Elisa y de la ADN polimerasa Pol Zeta en su forma de tamaño completo por transferencia de Western.

- 25 Los péptidos 1 y 4 comprenden una C en la posición 1 y la posición terminal, respectivamente. Este residuo de cisteína no está presente en la secuencia de POLQ y este aminoácido se ha añadido para facilitar la inmunización. Los anticuerpos reconocen bien esta secuencia, pero, sin embargo, en la secuencia de POLQ no existe tal residuo de cisteína.

Los mejores ratones se retienen para la fusión de sus linfocitos con células de mieloma Sp2/O-Ag14.

- 30 Los clones se criban, se seleccionan por un ensayo ELISA en péptidos acoplados a BSA y luego se analizan para determinar su capacidad para reconocer la ADN polimerasa Zeta por transferencia de Western e inmunofluorescencia en células de mamíferos. Los hibridomas seleccionados después por clonación y estabilización: 1B1-3D4-2C5; 18E1-3E12; 10B2-3B10-3D1 y 15G9-3D5 se utilizaron para la producción y purificación de los anticuerpos 1B1, 18E1, 10B2 y 15G9, respectivamente.

- 35 **Ejemplo 2: inmunodetección por transferencia de Western de la ADN polimerasa Zeta ectópica en fibroblastos de pulmón que sobre-expresan establemente la ADN polimerasa Zeta.**

Leyendas de la figura 1

- 40 Figura 1: (A) Revelado por transferencia de Western de la ADN polimerasa Zeta ectópica en su forma de tamaño completo gracias al uso de los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, 10B2, 18E1 y 15G9, en fibroblastos de pulmón MRC5-SV que sobre-expresan (Q14) o no (Ctrl2) Pol Zeta de forma estable.

(B) La especificidad de la señal generada por los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1 y 10B2 se confirmó en fibroblastos de pulmón que sobre-expresan establemente Pol Zeta (MRC5-SV-POLQ:Q14), 24 h después de la transfección por

siRNA de control dirigido contra luciferasa (siRNA *LUC*) o un siRNA dirigido específicamente contra *POLQ* (siRNA *POLQ*).

### Resultados

5 El uso de los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, 10B2, 18E1 y 15G9 procedentes de los líquidos sobrenadantes de los  
 10 hibridomas permite la detección de la ADN polimerasa Zeta ectópica en su forma de tamaño completo en células  
 MRC5-SV-*POLQ* (Q14) que sobre-expresan la proteína Pol Zeta de forma estable, en comparación con las células  
 que no la sobre-expresan (células Ctrl2 transfectadas por el vector vacío) (Figura 1-A). La especificidad de los  
 anticuerpos 1B1 y 10B2 para Pol Zeta se confirmó en muestras Q14 gracias al uso de siRNA dirigidos  
 específicamente contra *POLQ*, lo que conduce a la extinción de la proteína y por lo tanto de la señal generada por  
 estos anticuerpos (Figura 1-B). Se obtiene un resultado idéntico cuando los anticuerpos anti-Pol Zeta purificados se  
 usan en transferencia de Western a una dilución de 0,1 µg/mL.

### Material y Métodos

15 La línea celular MRC5-SV se transfectó de forma estable con un vector vacío (pcDNA3.1, Ctrl2) o un vector que  
 codifica la ADN polimerasa Zeta (pcDNA3.1-*POLQ*, Q14). Las células Ctrl2 y Q14, después de la tripsinización y  
 lavados con PBS, se incubaron en hielo durante 30 minutos en el tampón de lisis (Tris-HCl: 50 mM, pH 7,5, NaCl:  
 250 mM, EDTA: 1 mM, Triton X100: 0,1%, inhibidores de proteasas). Después de la centrifugación a 13000 rpm  
 durante 20 min, el líquido sobrenadante se recoge, se valora y se conserva en Leammli. Se depositaron 40 µg de  
 proteínas en un gel con gradiente de Tris acetato al 3-8% (Nupage Novex Invitrogen) o en un gel de acrilamida al  
 6%. Después de la migración a 150 V durante 1 h 15 min, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF  
 20 en un tampón frío que contenía CAPS (Sigma) 10 mM a pH 11, etanol al 10% y SDS al 0,01%, durante 2 horas a  
 200 mA con agitación. Los sitios no específicos de la membrana se saturaron luego durante 1 h en tampón PBS-  
 Tween al 0,1% (PBS-T 0,1%), y leche desnatada al 5%. La membrana se incubó luego durante una noche a 4°C en  
 PBS-T al 0,1% con los diversos anticuerpos: anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, 10B2, 18E1 o 15G9 (líquidos  
 sobrenadantes de hibridomas diluido 10 veces). Después de 3 lavados durante 10 minutos en PBS-T al 0,1%, las  
 25 membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP diluido 10000 veces (Jackson  
 ImmunoResearch), en PBS-T al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 nuevos lavados de 10  
 min con PBS-T al 0,1%, el revelado se lleva a cabo con ECL-plus (Pierce).

30 Con el fin de garantizar la especificidad de la señal generada por los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1 y 10B2, las  
 células que sobre-expresan establemente la proteína Pol Zeta ectópica (Q14) se transfectaron por siRNA que se  
 dirige a luciferasa (siRNA *LUC*, Sigma) o específicamente a la ADN polimerasa Zeta (siRNA *POLQ*, en *Target Plus  
 Smart Pool Dharmacon* L-015180-01) a 60 nM con lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del  
 proveedor. 24 h después de la transfección, las células se recuperaron por tripsinización, se lavaron con PBS y  
 luego se lisaron en el tampón de lisis. Los extractos celulares se trataron como se describió anteriormente.

### 35 Ejemplo 3: Inmunodetección por transferencia de Western de la ADN polimerasa Zeta endógena en células tumorales colorrectales RKO.

Leyenda de la figura 2

40 Figura 2: Revelado por transferencia de Western de ADN polimerasa Zeta endógena en su forma de tamaño  
 completo (290 kDa) gracias al uso de los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1 y 10B2 en células de cáncer colorrectal  
 (RKO), 24 h después de la transfección por un siRNA de control dirigido contra luciferasa (siRNA *LUC*) o un siRNA  
 dirigido específicamente contra *POLQ* (siRNA *POLQ*).

### Resultados

45 El uso de líquidos sobrenadantes de hibridomas que contienen el anticuerpo anti-Pol Zeta 1B1 o 10B2 permite la  
 detección de ADN polimerasa Zeta endógena en su forma de longitud completa (290 kDa) en las células RKO. La  
 señal generada por los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1 o 10B2 se extingue después de la extinción de la proteína Pol  
 Zeta después de la transfección por siRNA *POLQ*, demostrando así la especificidad de los anticuerpos utilizados  
 para la detección del ADN Pol Zeta (Figura 2). La transferencia de Western de DNA-PKcs se utiliza como control de  
 carga proteica. Se obtiene un resultado idéntico cuando los anticuerpos anti-Pol Zeta purificados se usan en  
 transferencia de Western a una dilución de 0,1 µg/mL.

### Material y Métodos

50 La línea celular RKO se transfectó con siRNA dirigido a la luciferasa (siRNA *LUC*, Sigma-Aldrich), la ADN polimerasa  
 Zeta (siRNA *POLQ*, en el *Target Plus Smart Pool Dharmacon* L-015180-01) a 60 nM con lipofectamina 2000  
 (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor. 24 h después de la transfección, las células se recuperaron por  
 tripsinización, se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 30 minutos en el tampón de lisis (Tris-HCl: 50 mM,  
 pH 7,5, NaCl: 250 mM, EDTA: 1 mM, Triton X100: 0,1%, inhibidores de proteasas) en hielo. Después de la  
 55 centrifugación a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, el sobrenadante se retiró, se valoró y se conservó en  
 Leammli. Se depositaron 40 µg de proteínas en un gel con gradiente Tris acetato al 3-8% (Nupage Novex Invitrogen)

o en un gel de acrilamida al 6%. Después de la migración a 150 V durante 1 h 15 min, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF en un tampón frío que contenía CAPS (Sigma) 10 mM a pH 11, EtOH al 10% y SDS al 0,01%, durante 2 horas a 200 mA con agitación. Los sitios no específicos de la membrana se saturaron luego durante 1 hora en un tampón PBS-Tween (PBS-T) al 0,1%, y leche desnatada al 5%. La membrana se incubó luego durante una noche a 4°C en PBS-T al 0,1% que contenía anticuerpo anti-Pol Zeta 1B1 o 10B2 (líquidos sobrenadantes de hibridomas diluidos 10 veces) o el anticuerpo anti-DNA-PKcs (monoclonal de ratón, ab1832, Abcam, control de carga) diluido 5000 veces. Después de 3 lavados durante 10 minutos con PBS-T al 0,1%, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a HRP diluido 10000 veces (Jackson ImmunoResearch), en PBS-T al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 nuevos lavados de 10 min con PBS-T al 0,1%, el revelado se llevó a cabo con ECL-plus (Pierce).

#### **Ejemplo 4: Ensayos de anticuerpos comerciales anti-Pol Zeta para inmunodetección por transferencia de Western de ADN Pol Zeta ectópica (en células Q14) y endógena (en células RKO)**

Figura 3: Uso de anticuerpos anti-Pol Zeta disponibles comercialmente para la detección por transferencia de Western de: (i) Pol Zeta ectópica en fibroblastos de pulmón MRC5-SV que sobre-expresan (Q14) o no (Ctrl2) Pol Zeta establemente y (ii) Pol Zeta endógena en células RKO, 24 horas después de transfección por un siRNA de control dirigido contra la luciferasa (siRNA *LUC*) o un siRNA dirigido específicamente contra *POLQ* (siRNA *POLQ*).

#### **Resultados**

Los anticuerpos comerciales procedentes de Sigma (SAB1402530 y AV49203) o de Santa Cruz (N18 sc-10991 y D15 sc-10992) detectan una banda específica, que corresponde aproximadamente al peso molecular esperado para Pol Zeta en las células Q14 y Ctrl2, que no presenta variación de intensidad entre las células Q14 que sobre-expresan Pol Zeta con respecto a las (Ctrl2) que no la sobre-expresan (Figura 3).

En la línea RKO, estos cuatro anticuerpos también detectan bandas específicas alrededor de 290 kDa que no disminuyen en intensidad después de la extinción de la proteína por el siRNA *POLQ* (Figura 3).

El anticuerpo Sigma AV49203 revela también una banda de peso molecular mayor que el esperado para Pol Zeta en la línea RKO (siRNA *LUC*) que disminuye después de siRNA *POLQ* (Figura 3-D). Sin embargo, el tamaño de esta banda no corresponde al peso molecular esperado para Pol Zeta endógena y este anticuerpo no permite ya el revelado específico de la proteína Pol Zeta ectópica en las células Q14, que la sobre-expresan de forma estable con respecto a las células de control (Ctrl2) que no lo sobre-expresan (Figura 3-D).

#### **Material y Métodos**

La línea celular RKO se transfectó con siRNA dirigido a luciferasa (siRNA *LUC* Sigma-Aldrich) o la ADN polimerasa Zeta (siRNA *POLQ*, en el *Target Plus Smart Pool Dharmacon* L-015180-01) a 60 nM con lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor. 24 h después de la transfección, las células se recuperaron por tripsinización, se lavaron con PBS y luego se incubaron durante 30 minutos en el tampón de lisis como se describió anteriormente (Ejemplos 2 y 3). Los extractos celulares obtenidos se trataron de la misma manera que se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Las células MRC5-SV transfectadas establemente con un vector vacío (pcDNA3.1, Ctrl2) o un vector que codifica la ADN polimerasa Zeta (pcDNA3.1-POLQ, Q14) se recuperaron por tripsinización, se lavaron con PBS y luego se incubaron en hielo durante 30 minutos en el tampón de lisis como se describió anteriormente (Ejemplos 2 y 3). Los extractos celulares obtenidos se trataron de la misma manera que se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Las membranas obtenidas se incubaron luego durante una noche a 4°C en PBS-T al 0,1% con los diversos anticuerpos anti-Pol Zeta comerciales: los anticuerpos policlonales de cabra ADN Pol Zeta, N18 sc-10991 y D15 sc-10992 (Santa Cruz) diluidos 200 veces, el anticuerpo monoclonal de ratón POLQ, SAB1402530, y anticuerpo policlonal de conejo POLQ AV49203 (Sigma) diluido 1000 veces (es decir, 1 µg/mL) o con el anticuerpo anti-alfa actinina diluido 1000 veces (MAB1682, Millipore, usado como control de carga). Después de 3 lavados de 10 minutos con PBS-T al 0,1%, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundario anti-ratón, conejo o cabra acoplados a HRP diluido 10000 veces (Jackson ImmunoResearch), en PBS-T al 0,1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de 3 nuevos lavados de 10 min con PBS-T 0,1%, el revelado se lleva a cabo con ECL-plus (Pierce).

#### **Ejemplo 5: Inmunodetección por inmunofluorescencia de ADN polimerasa Zeta en fibroblastos de pulmón MRC5-SV que sobre-expresan establemente una forma ectópica de Pol Zeta (Q14).**

Figura 4: Detección de Pol Zeta por inmunofluorescencia en células MRC5-SV que sobre-expresan establemente la proteína Pol Zeta (MRC5-SV-POLQ: Q14) por el uso de los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, 18E1, 10B2 y 15G9.

#### **Resultados**

Se observa un marcaje intenso puntiforme presente en el conjunto del núcleo de ciertas células (las que sobre-expresan fuertemente la proteína Pol Zeta), puesto de manifiesto por los 4 anticuerpos. El núcleo de las células está marcado en azul y el marcaje correspondiente a Pol Zeta aparece en verde (Figura 4). Se obtiene un resultado idéntico cuando los anticuerpos anti-Pol Zeta purificados se usan en inmunofluorescencia a una dilución de 1 µg/mL.

- 5 Cabe señalar que el anticuerpo anti-Pol Zeta 10B2 genera también una señal específica en el núcleo.

### Material y Métodos

Las células MRC5-SV-POLQ (Q14) que sobre-expresan establemente la proteína Pol Zeta se sembraron en láminas de vidrio. 24 horas más tarde, las células se fijaron por PBS que contenía paraformaldehído al 4% y Triton al 0,1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de 3 lavados con PBS, las láminas se saturaron durante una hora en PBS, BSA al 1%, Triton al 0,1% y luego se lavaron con PBS. Las láminas se incubaron luego en presencia de los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, 18E1, 15G9 y 10B2 (líquidos sobrenadantes de hibridomas diluidos 10 veces) en PBS-BSA al 1% durante 3 horas a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y luego las láminas se incubaron con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® anti-ratón 488 (Alexa Fluor) durante 1 h. Después de 3 lavados con PBS, las láminas se montaron en portaobjetos utilizando un medio de montaje Vectashield que contenía Dapi para marcar los núcleos. Las células fueron observadas bajo un microscopio de fluorescencia.

### Ejemplo 6: Inmunodetección por inmunohistoquímica de la ADN polimerasa Zeta en fibroblastos de pulmón MRC5-SV que sobre-expresan establemente una forma ectópica de Pol Zeta

Figura 5: (A) Detección de ADN Pol Zeta por inmunohistoquímica con los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1 (10 µg/mL), 18E1 (2,2 µg/mL), 10B2 (1,8 µg/mL) y 15G9 (6 µg/mL) en cortes de fibroblastos de pulmón fijados con formol y luego incluidos en parafina MRC5-SV (Ctrl2) y MRC-SV-POLQ que sobre-expresan de forma estable la proteína Pol Zeta (Q14). (B) La especificidad de la señal generada por el anticuerpo anti-Pol Zeta 1B1 se confirmó en células Q14, 24 h después de la transfección por un siRNA de control dirigido contra luciferasa (siRNA *LUC*) o un siRNA dirigido específicamente contra POLQ (siRNA *POLQ*).

### Resultados

El núcleo de las células está marcado en azul y el marcaje correspondiente a la proteína Pol Zeta aparece en pardo (Figura 5). La Figura 5A muestra un marcaje predominantemente nuclear (2+), así como un marcaje citoplásmico menos intensa en 30% y 10 a 20% de células Q14 con los anticuerpos 1B1 y 10B2 respectivamente, mientras que las células Ctrl2 no están marcadas. En presencia del anticuerpo 15G9, el 5% de las células Q14 presenta un marcaje nuclear (1+). En presencia del anticuerpo 18E1, el 80% de las células Q14 presenta un marcaje citoplasmático granular (1+ a 2+) y el 60% de las células Ctrl2 presenta un marcaje citoplásmico (1+). La especificidad del anticuerpo 1B1 para Pol Zeta se confirmó en células Q14 por el uso de siRNA dirigido específicamente contra *POLQ*, dando como resultado una disminución significativa en el número de células que sobre-expresan la ADN Pol Zeta (Figura 5B).

### Material y Métodos

Después de cultivar las células MRC5-SV Ctrl2 y Q14 a 37°C y centrifugarlas, se fijan en formol y se incluyen en parafina según los procedimientos vigentes en el laboratorio de anatomía patológica. Los bloques de tejido se cortan con un microtomo a un espesor de 3 µm y luego se extienden en portaobjetos de vidrio y se secan en una placa caliente a 56°C durante 10 minutos y durante una noche en una estufa a 37°C. Los portaobjetos blancos se conservan a 4°C. Los portaobjetos se sacan durante 30 minutos a temperatura ambiente. El desparafinado y desenmascaramiento de los sitios antigénicos se realizan a pH 9 en el robot PTLINK (Dako) durante 20 min. Los portaobjetos blancos se tecnifican luego con el kit EnVision (Dako) a temperatura ambiente. Entre cada reactivo puesto en contacto con el corte, se lava en presencia de un tampón de lavado a base de Tris pH 7,6. El bloqueo de las peroxidasas con peróxido de hidrógeno se lleva a cabo durante 5 minutos para eliminar el ruido de fondo debido a la presencia de peroxidasas endógenas. El corte se incuba con el anticuerpo primario anti-Pol Zeta durante 20 min. El anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP se incuba durante 20 min. El portaobjetos blanco se incuba durante 10 minutos en presencia del sustrato cromógeno (DAB) y luego 3 minutos en presencia del contra colorante hematoxilina (núcleos azules). El portaobjetos blanco se lava finalmente con agua destilada antes de la deshidratación en baños de alcohol de grado creciente y luego en baños de xileno. El montaje se realiza en un robot *Tissue Tek Sakura*. La lectura de la coloración y la determinación de la intensidad de esta coloración y el porcentaje de células tumorales positivas son realizadas por un médico especialista en anatomía patológica. Los portaobjetos se escanean y digitalizan con el escáner de portaobjetos Nanozoomer (Hamatsu). Las fotos se obtienen por selección, gracias al programa informático ScreenHunter, de la parte de interés del portaobjeto digitalizado a 400 aumentos en el programa informático NDP View.

Con el fin de garantizar la especificidad de la señal generada por los anticuerpos anti-Pol Zeta 1B1, las células Ctrl2 y Q14 fueron transfectadas por siRNA dirigido contra luciferasa (siRNA *LUC*, Sigma) o específicamente la ADN polimerasa Zeta (siRNA *POLQ*, en *Target Plus Smart Pool Dharmacon* L-015180-01) a 60 nM con lipofectamina 2000 (Invitrogen) según las instrucciones del proveedor. Las inmunodetecciones de la figura 5B se llevaron a cabo en las mismas condiciones que anteriormente, excepto por el uso adicional del *Mouse Linker* (Dako) que permite una



amplificación de la señal de los anticuerpos primarios. Los 200 aumentos se mantuvieron para la visualización de la cantidad de células que sobre-expresan Pol Zeta.

#### **Ejemplo 7: Inmunoprecipitación de la ADN polimerasa Pol Zeta por los anticuerpos 18E1, 10B2, 15G9 y 1B1.**

5 Figura 6: (A) Detección de Pol Zeta después de inmunoprecipitación realizada por los anticuerpos 18E1, 10B2, 1B1 o 15G9. (B) Detección de Pol Zeta en la fracción inicial (FI) y después de la inmunoprecipitación (IP) realizada por los anticuerpos 18E1 o 1B1 o por las inmunoglobulinas de control IgG1 e IgG2a. (C) Detección de Pol Zeta en la fracción inicial (FI) y después de inmunoprecipitación (IP) realizada por los anticuerpos 18E1 o 1B1 en las células RKO, 24 h después de la transfección por un siRNA de control o dirigido contra *POLQ*.

#### **Resultados**

10 La inmunoprecipitación realizada utilizando los anticuerpos 18E1, 10B2, 1B1 y 15G9 en células humanas RKO hace posible recuperar la presencia de la proteína Pol Zeta de longitud completa en el inmunoprecipitado (IP) revelado por transferencia de Western (Figura 6A) y esto de modo enriquecido con respecto a la fracción de partida (FI, antes de la inmunoprecipitación) (Figura 6B). Además, el uso de inmunoglobulinas de control de tipo IgG1 e IgG2a no permite la inmunoprecipitación de Pol Zeta (ausencia de señal), lo que demuestra la especificidad de los anticuerpos 18E1 y 15G9 para Pol Zeta (Figura 6B). La especificidad de los anticuerpos 18E1 y 1B1 se mejoró aún más por un experimento de inmunoprecipitación realizado después de la extinción de la expresión de la proteína Pol Zeta por transfección de las células RKO por un siRNA de control (*CTRL*) o dirigido contra *POLQ*. De hecho, la intensidad de la señal correspondiente a Pol Zeta en la fracción inicial (FI) y en el inmunoprecipitado (IP) está muy significativamente disminuida después de la extinción de la proteína por transfección con el siRNA *POLQ* en comparación con el siRNA *CTRL* (Figura 6C).

#### **Material y Métodos**

25 20x10<sup>6</sup> células humanas RKO se lisaron en 1 mL de tampón de IP (Tris 50 mM, pH 8, NaCl 150 mM, EGTA 3 mM, NP40 al 1%, inhibidores de proteasas y fosfatasas) y se conservaron en hielo durante 30 min. Después de centrifugación a 13.000 rpm durante 10 min a 4°C, el líquido sobrenadante se incubó con 40 µL de proteínas A y G *dynabeads* (Invitrogen) durante 1 hora a 4°C en una rueda. Después de la retirada de las bolas, se incubaron 5 µg de los anticuerpos 18E1, 15G9, 10B2 o 1B1 con los líquidos sobrenadantes a 4°C en una rueda durante 2 h 30 min. Luego se añadieron 40 µL de proteínas A y G *dynabeads* (Invitrogen) durante 2 horas más. Después de 3 lavados con el tampón de IP, el material inmunoprecipitado se volvió a poner en suspensión en 60 µL de Laemmli, se hirvió durante 3 minutos y se analizó por transferencia de Western. El revelado de Pol Zeta por transferencia de Western se efectuó gracias al uso del anticuerpo 1B1 (0,1 µg/mL) como se ha descrito anteriormente.

#### **Ejemplo 8: Detección con anticuerpo 15G9 por IF por un método de amplificación de señales PLA (*Proximity Ligation Assay*)**

La Figura 7 ilustra la detección por IF por método de un método de amplificación de señales PLA en el caso de células transfectadas con un siRNA dirigido contra *POLQ* (*siPOLQ*) o un siRNA de control (*siCTRL*).

#### **Resultados**

35 Las células RKO se transfectaron con un siRNA dirigido contra *POLQ* (*siPOLQ*) o un siRNA de control (*siCTRL*), luego se fijaron 72 horas y después en PFA al 4%. Un ensayo PLA (*Proximity Ligation Assay*) se realizó según las instrucciones del fabricante (Duolink *in situ* PLA assay, Sigma Aldrich), con anticuerpos dirigidos a Pol Zeta (15G9) y *ORC4* (*ORC4*-H300, sc-20634, Santa Cruz Biotechnology).

40 En la condición *siCTRL*, la señal atestigua la presencia y proximidad de las 2 proteínas, corroborando así los resultados de co-inmunoprecipitación publicados previamente. En la condición *siPOLQ*, la señal desaparece, atestiguando la especificidad de la señal en condición de control.

#### **Material y Métodos:**

45 Las células RKO se transfectaron con siRNA a 50 nM usando lipofectamina 2000 según lo recomendado por el proveedor. 72 horas después de la transfección, las células se fijaron con PBS, PFA al 4% durante 15 min, se lavaron 3 veces con PBS y luego se permeabilizaron en PBS, Triton al 0,5% durante 5 min. Después de 3 lavados con PBS, se realizó un PLA según el protocolo provisto con el kit. Las células se observaron mediante microscopía de fluorescencia de campo amplio.

#### **Ejemplo 9: Co-inmunoprecipitación de Pol Zeta con *Orc2* y *Orc4***

50 Figura 8: Ilustra la co-inmunoprecipitación de la ADN polimerasa Pol Zeta (con 18E1) con *Orc2* y *Orc4*.

**Resultados**

5 Los extractos celulares obtenidos en células RKO se inmunoprecipitaron con el anticuerpo anti-ADN polimerasa Pol Zeta 18E1 o una IgG de control, y se analizaron por transferencia de Western usando los anticuerpos indicados. La co-detección de la ADN polimerasa Zeta-ORC4 constituye un ensayo para validar la evaluación de los anticuerpos en PLA. Se eligió ORC4 porque ya se ha demostrado que estas dos proteínas co-inmunoprecipitan. La ausencia de señal en las pistas de IgG muestra la especificidad de la inmunoprecipitación de Pol Zeta por el anticuerpo.

**Material y Métodos:** Similares y correspondientes a los del Ejemplo 7.

**LISTA DE SECUENCIAS**

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM) UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III

5 <120> NUEVOS ANTICUERPOS ÚTILES PARA EL DIAGNÓSTICO Y EL PRONÓSTICO DEL CANCER

<130> 367600D32932

<150> FR1453333

10 <151> 14-04-2014

<160> 76

<170> PatentIn versión 3.5

15

<210> 1

<211> 20

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> Péptido 1 utilizado para la inmunización

<400> 1

Cys Lys His Ser Pro Asn Ile Val Gln Asp Leu Asn Lys Ser Arg Glu  
1 5 10 15

25

His Thr Ser Ser  
20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

30 <213> artificial

<220>

<223> Péptido 2 utilizado para la inmunización

35

<400> 2

Cys Ser Ile Phe Arg Ala Arg Lys Arg Ala Ser Leu Asp Ile Asn Lys  
1 5 10 15

Glu Lys Pro Gly  
20

<210> 3

<211> 19

40 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Péptido 3 utilizado para la inmunización

45

<400> 3

Cys Leu Gln Glu Asp Leu Ile Lys Lys Ser Asn Val Asn Glu Asn Gln  
1 5 10 15

Asp Thr His

<210> 4

50 <211> 21

<212> PRT

<213> artificial

ES 2 714 866 T3

<220>

<223> Péptido 4 utilizado para la inmunización

<400> 4

His Asp Glu Thr Ser Ser Leu Leu Pro Arg Lys Glu Ser Asn Ile Val  
 1 5 10 15

5 Asp Asp Asn Gly Cys  
 20

<210> 5

<211> 8

<212> PRT

10 <213> artificial

<220>

<223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H1

15 <400> 5

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp  
 1 5

<210> 6

<211> 8

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H2

25 <400> 6

Ile Asp Pro Ser Asp Arg Tyr Thr  
 1 5

<210> 7

30 <211> 7

<212> PRT

<213> artificial

<220>

35 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H3

<400> 7

Thr Met Tyr Ser Phe Ala Tyr  
 1 5

<210> 8

40 <211> 11

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L1

<400> 8

Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10

50 <210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> artificial

55 <220>

<223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L2

ES 2 714 866 T3

<400> 9  
 Leu Val Ser  
 1

5 <210> 10  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L3

<400> 10  
 Val Gln Gly Ala His Leu Pro Gln Thr  
 1 5

15 <210> 11  
 <211> 114  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - Dominio variable cadena pesada

<400> 11  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 25 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Ile Gln Trp Ile Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Arg Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Met Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ala

30 <210> 12  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - Dominio variable cadena ligera

35 <400> 12

ES 2 714 866 T3

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

Arg

- 5 <210> 13  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 10 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2H1  
 <400> 13  
 Gly Asp Thr Phe Thr Asp Tyr Pro  
 1 5
- 15 <210> 14  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 20 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2H2  
 <400> 14  
 Ile Asn Ala Glu Thr Ala Glu Pro  
 1 5
- 25 <210> 15  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial
- 30 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2H3
- 35 <400> 15  
 Ala Ser Ser Tyr Gly Tyr  
 1 5
- <210> 16

<211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2L1

<400> 16  
 Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asp Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10

10 <210> 17  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2L2

<400> 17  
 Leu Val Ser  
 1

20 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

25 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR2L3

30 <400> 18  
 Val Gln Gly Ser His Phe Pro His Thr  
 1 5

35 <210> 19  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - Dominio variable cadena pesada

<400> 19

ES 2 714 866 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Pro Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Glu Thr Ala Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Phe  
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
85 90 95

Ala Ser Ser Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
100 105 110

Ala

- 5 <210> 20
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> artificial

- 10 <220>
- <223> Anticuerpo 18E1 - Dominio variable cadena ligera

<400> 20  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
85 90 95

Ser His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
100 105 110

Arg



<210> 21  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR3H1  
 <400> 21  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr  
 10 1 5  
 <210> 22  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR3H2  
 20 <400> 22  
 Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ser  
 1 5  
 <210> 23  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR3H3  
 30 <400> 23  
 Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Thr Ser Phe Val Met Phe Ala His  
 1 5 10 15  
 <210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR3L1  
 40 <400> 24  
 Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr  
 1 5 10  
 45 <210> 25  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 50 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR3L2  
 <400> 25  
 Tyr Met Ser  
 1  
 55 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 60 <220>

ES 2 714 866 T3

<223> Anticuerpo 10B2 - CDR3L3

<400> 26

Met Gln Ser Leu Glu Tyr Pro Val Thr  
1 5

5

<210> 27

<211> 122

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Anticuerpo 10B2 - Dominio variable cadena pesada

<400> 27

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Thr Leu Glu Trp Ile  
35 40 45

Gly Asp Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Ser His Tyr Asn Gln Lys Phe  
50 55 60

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

Met Asp Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Ser Gly Thr Ser Phe Val Met Phe Ala His Trp  
100 105 110

15

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
115 120

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> artificial

20

<220>

<223> Anticuerpo 10B2 - Dominio variable cadena ligera

25

<400> 28

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

ES 2 714 866 T3

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser  
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Met Ser Asn Pro Ala Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

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

Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
 85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

5 <210> 29  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR4H1

<400> 29  
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala  
 1 5

15 <210> 30  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR4H2

<400> 30  
 Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Ala  
 1 5

25 <210> 31  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR4H3

<400> 31  
 Ala Thr Gly Phe Asn Tyr  
 1 5

35 <210> 32  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> artificial

40 <220>

ES 2 714 866 T3

<223> Anticuerpo 15G9 - CDR4L1

<400> 32  
 Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr  
 1 5 10

5

<210> 33  
 <211> 3  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR4L2

<400> 33  
 Leu Val Ser  
 1

15

<210> 34  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> artificial

20

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR4L3

25

<400> 34  
 Leu Gln Ala Thr His Phe Pro His Thr  
 1 5

<210> 35  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> artificial

30

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - Dominio variable cadena pesada

35

<400> 35  
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu 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 Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Ala Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Thr Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

40

Ser

ES 2 714 866 T3

<210> 36  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> artificial

5

<220>  
<223> Anticuerpo 15G9 - Dominio variable cadena ligera

<400> 36  
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala  
85 90 95

10 Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg

15 <210> 37  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> artificial

20 <220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - Cadena pesada

<400> 37

ES 2 714 866 T3

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

ES 2 714 866 T3

Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His  
 195 200 205

Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys  
 210 215 220

Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe  
 225 230 235 240

Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro  
 245 250 255

Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val  
 260 265 270

Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr  
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu  
 290 295 300

Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys  
 305 310 315 320

Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser  
 325 330 335

Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro  
 340 345 350

Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile  
 355 360 365

Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly  
 370 375 380

Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp  
 385 390 395 400

Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp  
 405 410 415

Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His  
 420 425 430

Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435 440 445

5 <210> 38  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 – Cadena ligera

ES 2 714 866 T3

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Thr Lys Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser  
35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Tyr Met Ser Asn Pro Ala Ser Gly Val Pro  
50 55 60

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

Ser Arg Val Gly Ala Glu Asp Val Gly Ile Tyr Tyr Cys Met Gln Ser  
85 90 95

Leu Glu Tyr Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

5

<210> 39

<211> 438

<212> PRT

<213> artificial

10

<220>

<223> Anticuerpo 1B1 - Cadena pesada

<400> 39



ES 2 714 866 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
 20 25 30

Trp Ile Gln Trp Ile Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Arg Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Thr Met Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val  
 100 105 110

Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly  
 115 120 125

Ser Ala Ala Gln Thr Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys  
 130 135 140

Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu  
 145 150 155 160

Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr  
 165 170 175

Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln  
 180 185 190

ES 2 714 866 T3

Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp  
 195 200 205

Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr  
 210 215 220

Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 225 230 235 240

Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 245 250 255

Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp  
 260 265 270

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Ile Asn  
 275 280 285

Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp  
 290 295 300

Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro  
 305 310 315 320

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala  
 325 330 335

Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp  
 340 345 350

Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile  
 355 360 365

Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn  
 370 375 380

Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys  
 385 390 395 400

Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys  
 405 410 415

Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu  
 420 425 430

Ser His Ser Pro Gly Lys  
 435

<210> 40  
 <211> 219  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - Cadena ligera

10 <400> 40

ES 2 714 866 T3

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser  
 20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Ser Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
 85 90 95

Ala His Leu Pro Gln Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

5 <210> 41  
 <211> 443  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - Cadena pesada

<400> 41

ES 2 714 866 T3

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Asp Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30

Pro Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Ala Glu Thr Ala Glu Pro Thr Tyr Val Asp Asp Phe  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Ser Ser Ala Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

Ala Ser Ser Tyr Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser  
 100 105 110

Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys  
 115 120 125

Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly  
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser  
 145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr  
 165 170 175

Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser  
 180 185 190

ES 2 714 866 T3

Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys  
 195 200 205

Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys  
 210 215 220

Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro  
 225 230 235 240

Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr  
 245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser  
 260 265 270

Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His  
 275 280 285

Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile  
 290 295 300

Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn  
 305 310 315 320

Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys  
 325 330 335

Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu  
 340 345 350

Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe  
 355 360 365

Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu  
 370 375 380

Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr  
 385 390 395 400

Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg  
 405 410 415

Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His  
 420 425 430

Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 435 440

<210> 42  
 <211> 219  
 5 <212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - Cadena ligera

10 <400> 42

ES 2 714 866 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
 1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser  
 20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro  
 50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Val Gln Gly  
 85 90 95

Ser His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn  
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
 130 135 140

Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
 145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
 180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
 195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
 210 215

5 <210> 43  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> artificial

10 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - Cadena pesada

<400> 43

ES 2 714 866 T3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu 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 Val Ile Arg Thr Tyr Ser Gly Asp Ala Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Thr Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser  
 100 105 110

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

Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly  
 130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Ser Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser  
 145 150 155 160

Ser Ser Val His Thr Phe Pro Ala Leu Leu Gln Ser Gly Leu Tyr Thr  
 165 170 175

Met Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Thr  
 180 185 190

Val Thr Cys Ser Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Thr Val Asp Lys

# ES 2 714 866 T3

195 200 205

Lys Leu Glu Pro Ser Gly Pro Ile Ser Thr Ile Asn Pro Cys Pro Pro  
 210 215 220

Cys Lys Glu Cys His Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro  
 225 230 235 240

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Asn Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser  
245 250 255

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp  
260 265 270

Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr  
275 280 285

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Ile Arg Val  
290 295 300

Val Ser Thr Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu  
 305 310 315 320

Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg  
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ile Lys Gly Leu Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Ile  
340 345 350

Leu Pro Pro Pro Ala Glu Gln Leu Ser Arg Lys Asp Val Ser Leu Thr  
355 360 365

Cys Leu Val Val Gly Phe Asn Pro Gly Asp Ile Ser Val Glu Trp Thr  
 370 375 380

Ser Asn Gly His Thr Glu Glu Asn Tyr Lys Asp Thr Ala Pro Val Leu  
 385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Met Lys Thr  
405 410 415

Ser Lys Trp Glu Lys Thr Asp Ser Phe Ser Cys Asn Val Arg His Glu  
420 425 430

Gly Leu Lys Asn Tyr Tyr Leu Lys Lys Thr Ile Ser Arg Ser Pro Gly  
 435 440 445

Lys

5 <210> 44  
 <211> 219  
 <212> PRT  
 <213> artificial



ES 2 714 866 T3

<220>

<223> Anticuerpo 15G9 - Cadena ligera

<400> 44

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly  
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser  
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Glu Ser Gly Val Pro  
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Leu Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala  
85 90 95

Thr His Phe Pro His Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu  
115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe  
130 135 140

Tyr Pro Arg Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
165 170 175

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu  
180 185 190

5 Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser  
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys  
210 215

10 <210> 45  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H1

<400> 45  
ggctacacct tcaccaacta ctgg 24

<210> 46  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 5 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H2  
  
 10 <400> 46  
 attgatcctt ctgatagata tact 24  
  
 <210> 47  
 <211> 21  
 15 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1H3  
 20  
 <400> 47  
 acaatgtatt cgttgctta c 21  
  
 <210> 48  
 <211> 33  
 25 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 <220>  
 30 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L1  
  
 <400> 48  
 cagagcctct tagatagta tggaaaaacc tat 33  
  
 35 <210> 49  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
  
 40 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L2  
  
 <400> 49  
 ctgggtct 9  
 45  
 <210> 50  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 50  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - CDR1L3  
  
 <400> 50  
 55 gtgcaagggtg cacatctccc tcaaacg 27  
  
 <210> 51  
 <211> 342  
 <212> ADN  
 60 <213> artificial  
  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - Dominio variable cadena pesada  
  
 65 <400> 51

ES 2 714 866 T3

caggtccaac tgcagcagcc tggggctgac cttgtgaagc ctggggcttc agtgaagctc 60  
 tcctgcaaga cctctggcta caccttcacc aactactgga tacagtggat aaaacagaag 120  
 cctggacagg gccttgagtg gatcggagag attgatcctt ctgatagata tactaattac 180  
 aatcaaagat tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca catcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca acagcctaac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aatgtattcg 300  
 tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg ca 342

<210> 52  
 <211> 339  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 1B1 - Dominio variable cadena ligera

10 <400> 52  
 gatgttgtga tgaccagac tccactcact ttgtctgta ccattggaca gccagcttcc 60  
 atttcttga agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaaaaccta tttgaattgg 120  
 ttattacaga gtccaggcca gtctccaaag ctcttaatct atctgggtgc taagctggaa 180  
 tctggagtcc ctgacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaaggtgc acatctccct 300  
 caaacgttcg gatcggggac caaactggaa ataaaacgg 339

<210> 53  
 <211> 24  
 15 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1H1

<400> 53  
 ggtgacacct tcacagacta tcca 24

25 <210> 54  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial

30 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1H2

<400> 54  
 ataaacgctg agactgctga gcca 24

35 <210> 55  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial

40 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1H3

<400> 55  
 45 gctagtctct atggttac 18

<210> 56

ES 2 714 866 T3

<211> 33  
 <212> ADN  
 <213> artificial

5 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1L1

<400> 56  
 cagagcctct tatatagtgga tggaaaaacc tat 33

10 <210> 57  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> artificial

15 <220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1L2

<400> 57  
 20 ctggtgtct 9

<210> 58  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 25 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - CDR1L3

30 <400> 58  
 gtgcaaggt cacattccc tcatacg 27

<210> 59  
 <211> 339  
 35 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 18E1 - Dominio variable cadena pesada

40 <400> 59  
 cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60  
 tcctgcaagg cttctggtga caccttcaca gactatccaa tgcactgggt gaagcaggct 120  
 ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacgctg agactgctga gccaacatat 180  
 gtagacgact tcaagggacg gtttgccctc tctttggaat cctctgccag cactgcctat 240  
 ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc tagttcctat 300  
 ggttactggg gccaaggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 60  
 45 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 50 <223> Anticuerpo 18E1 - Dominio variable cadena ligera  
 <400> 60

ES 2 714 866 T3

gatattgtga tgaccagac tccactcact ttgtctgta ccattggaca gccagcttcc 60  
 atttcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtgatg gaaaaaccta tttgaattgg 120  
 ttattccaga gtccaggcca gtctccaaag ctcttaatct atctgggtgc taaactggaa 180  
 tctggagtcc ctgacagatt cagtggcagt ggatcaggga cagattttac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattactgcg tgcaagggtc acatttcctt 300  
 catacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaccgg 339

<210> 61  
 <211> 24  
 5 <212> ADN  
 <213> artificial

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1H1  
 10

<400> 61  
 ggctacacat tcaactgatta tgct 24

<210> 62  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 15

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1H2  
 20

<400> 62  
 attcgtactt actctgggta tgct 24

<210> 63  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 25

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1H3  
 30

<400> 63  
 gcaaccgggt ttaactac 18  
 35

<210> 64  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 40

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1L1  
 45

<400> 64  
 cagagcctct tacatagtaa tggaaagaca tat 33

<210> 65  
 <211> 9  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 50

<220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1L2  
 55

<400> 65  
 ctggtgtct 9

ES 2 714 866 T3

<210> 66  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - CDR1L3  
 <400> 66  
 10 ttgcaagcta cacatttcc tcatagc 27  
 <210> 67  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 15 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - Dominio variable cadena pesada  
 20 <400> 67  
 caggtccagc tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctgggggtctc agtgaagatt 60  
 tcctgcaagg gttctggcta cacattcact gattatgcta tgcactgggt gaagcagagt 120  
 catgcaaaga gtctagagtg gattggagtt attcgtactt actctgggtga tgctacctac 180  
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctat 240  
 atggaacttg ccagactgac atctgaggat tctgccatct attactgtgc aaccgggttt 300  
 aactactggg gccaaggcac cactctcaca gtctcctca 339  
 <210> 68  
 <211> 339  
 25 <212> ADN  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> Anticuerpo 15G9 - Dominio variable cadena ligera  
 30 <400> 68  
 gatgttgtga tgactcagac cccactcact ttgtcgggta ccattggaca accagcctcc 60  
 atctcttgca aatcaagtca gagcctctta catagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120  
 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag ctcttaatct atctggtgtc taaactggaa 180  
 tctggagtcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcagggc cagatttcac actgaaaatc 240  
 agcagagtgg aggctgagga tttgggactt tattactgct tgcaagctac acattttcct 300  
 catacgttcg gatcggggac caagctggaa ataaaacgg 339  
 <210> 69  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> artificial  
 35 <220>  
 <223> Anticuerpo 10B2 - CDR1H1  
 <400> 69  
 40 ggatacacgt tcaactgatta ctac 24  
 <210> 70  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 45

ES 2 714 866 T3

<213> artificial

<220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - CDR1H2

5 <400> 70  
attaatccta ataatggtgg tagt 24

10 <210> 71  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> artificial

15 <220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - CDR1H3

<400> 71  
gcaagaggcg attactccgg tactagtttc gttatgttg ctac 45

20 <210> 72  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> artificial

25 <220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - CDR1L1

<400> 72  
aagagtcttc tgacacgtaa tggcaacact tac 33

30 <210> 73  
<211> 9  
<212> ADN  
<213> artificial

35 <220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - CDR1L2

40 <400> 73  
tatatgtcc 9

<210> 74  
<211> 27  
<212> ADN  
45 <213> artificial

<220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - CDR1L3

50 <400> 74  
atgcaaagtc tagaatatcc tgtcacg 27

<210> 75  
<211> 366  
55 <212> ADN  
<213> artificial

<220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - Dominio variable cadena pesada

60 <400> 75  
gagggtccagc tgcaacaatc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcctc agttaagatt 60  
tcctgtaagg cttctggata cacgttcact gattactaca tgaactgggt gaagcagagc 120  
catggaaga cccttgagtg gattggagat attaatccta ataatggtgg tagtcactac 180

ES 2 714 866 T3

aaccagaagt tcaggggcaa ggccacattg actatagaca agtcctccag tacagcctac 240  
atggacctcc gcagcctgac atctgaagac tctgcagtct attactgtgc aagaggcgat 300  
tactccggta ctagtttcgt tatgtttgct cactggggcc aagggactct ggtcactgtc 360  
tctgca 366

5 <210> 76  
<211> 339  
<212> ADN  
<213> artificial

10 <220>  
<223> Anticuerpo 10B2 - Dominio variable cadena ligera

<400> 76  
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctctggaga gtcagtatcc 60  
atctcctgca ggtctactaa gagtcttctg cacagtaatg gcaacactta cttgtattgg 120  
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctctgatat attatatgtc caaccctgcc 180  
tcaggagtcc cagacagggt cagtggcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgaggatc 240  
agtcgagtgg gggctgagga tgtaggtatt tattactgta tgcaaagtct agaatacct 300  
gtcacgttcg gtgcggggac caagctggag ctgaaacgg 339

15



## REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal, caracterizado por que se selecciona del grupo que comprende los anticuerpos siguientes:
  - i. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
  - 5 ii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta,
  - iii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, caracterizado por que se selecciona del grupo que comprende los 4 anticuerpos siguientes:
  - i. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 21, SEQ ID 22, SEQ ID 23, SEQ ID 24, SEQ ID 25, SEQ ID 26,
  - 15 ii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 5, SEQ ID 6, SEQ ID 7, SEQ ID 8, SEQ ID 9, SEQ ID 10,
  - 20 iii. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 13, SEQ ID 14, SEQ ID 15, SEQ ID 16, SEQ ID 17, SEQ ID 18,
  - 25 iv. anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta, caracterizado por que dicho anticuerpo comprende las 6 CDR que comprenden las secuencias de aminoácidos respectivas siguientes: SEQ ID 29, SEQ ID 30, SEQ ID 31, SEQ ID 32, SEQ ID 33, SEQ ID 34.
3. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado por que:
  - i. el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - 30 i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR3H1, CDR3H2 y CDR3H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 21, SEQ ID 22 y SEQ ID 23,
    - ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR3L1, CDR3L2 y CDR3L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 24, SEQ ID 25 y SEQ ID 26,
  - ii. el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - 35 i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR1H1, CDR1H2 y CDR1H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7,
    - ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR1L1, CDR1L2 y CDR1L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 8., SEQ ID 9 y SEQ ID 10,
  - 40 iii. el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR2H1, CDR2H2 y CDR2H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 13, SEQ ID 14 y SEQ ID 15
    - 45 ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR2L1, CDR2L2 y CDR2L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 16, SEQ ID 17 y SEQ ID 18,
  - iv. el anticuerpo capaz de unirse a la secuencia de aminoácidos que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR4H1, CDR4H2 y CDR4H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 29, SEQ ID 30 y SEQ ID 31,

- ii. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR4L1, CDR4L2 y CDR4L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 32, SEQ ID 33 y SEQ ID 34.
4. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado por que:
- 5 i. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR3H1, CDR3H2 y CDR3H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 21, SEQ ID 22 y SEQ ID 23,
    - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 28
  - 10 ii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR1H1, CDR1H2 y CDR1H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 5, SEQ ID 6 y SEQ ID 7,
    - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 12,
  - 15 iii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR2H1, CDR2H2 y CDR2H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 13, SEQ ID 14 y SEQ ID 15,
    - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 20,
  - 20 iv. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta que comprende:
    - i. una cadena pesada que comprende las 3 CDR: CDR4H1, CDR4H2 y CDR4H3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 29, SEQ ID 30 y SEQ ID 31,
    - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 36.
  - 25 5. Anticuerpo según la reivindicación 2, caracterizado por que:
    - i. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
      - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR3L1, CDR3L2 y CDR3L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 24, SEQ ID 25 y SEQ ID 26,
      - 30 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 27,
    - ii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
      - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR1L1, CDR1L2 y CDR1L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 8, SEQ ID 9 y SEQ ID 10,
      - 35 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 11,
    - iii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
      - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR2L1, CDR2L2 y CDR2L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 16, SEQ ID 17 y SEQ ID 18,
      - 40 ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 19,
    - iv. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
      - i. una cadena ligera que comprende las 3 CDR: CDR4L1, CDR4L2 y CDR4L3 que tienen las secuencias respectivas siguientes SEQ ID 32, SEQ ID 33 y SEQ ID 34,

- ii. un dominio variable de cadena pesada que comprende la SEQ ID 35.
6. Anticuerpo según la reivindicación 3, caracterizado por que:
- i. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 1 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - 5 i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 27,
    - ii. un dominio variable de cadena ligera que comprende la SEQ ID 28,
  - ii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 2 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 11,
    - 10 ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 12,
  - iii. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Pol Zeta comprende:
    - i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 19,
    - ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 20,
  - 15 iv. el anticuerpo capaz de unirse a la fracción peptídica que tiene la SEQ 4 del dominio central de la ADN polimerasa Zeta comprende:
    - i. un dominio variable de la cadena pesada que comprende la SEQ ID 35,
    - ii. un dominio variable de la cadena ligera que comprende la SEQ ID 36.
7. Anticuerpo 1B1 según la reivindicación 1, que comprende:
- 20 i. una cadena pesada que comprende la secuencia SEQ ID 39,
  - ii. una cadena ligera que comprende la secuencia SEQ ID 40.
8. Anticuerpo 18E1 según la reivindicación 1, que comprende:
- i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 41,
  - ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 42.
9. Anticuerpo 10B2 según la reivindicación 1, que comprende:
- i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 37,
  - ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 38.
10. Anticuerpo 15G9 según la reivindicación 1, que comprende:
- i. una cadena pesada que comprende la SEQ ID 43,
  - 30 ii. una cadena ligera que comprende la SEQ ID 44.
11. Método para determinar *in vitro* o *ex vivo* el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en un sujeto que comprende las etapas siguientes:
- i. poner en contacto una muestra biológica obtenida del sujeto con un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 10
  - 35 ii. cuantificar el nivel de expresión de la ADN polimerasa Pol Zeta en el seno de la muestra.
12. Kit que comprende al menos un anticuerpo según una de las reivindicaciones 1 a 10.
13. Kit según la reivindicación 12, caracterizado por que comprende además un reactivo para detectar la unión del anticuerpo con la ADN polimerasa Pol Zeta.
14. Kit según una de las reivindicaciones 12 o 13, caracterizado por que comprende un reactivo para cuantificar el nivel de unión del anticuerpo con la ADN polimerasa Pol Zeta.
- 40

Tamaño esperado de Pol Zeta endógena: 290kDa

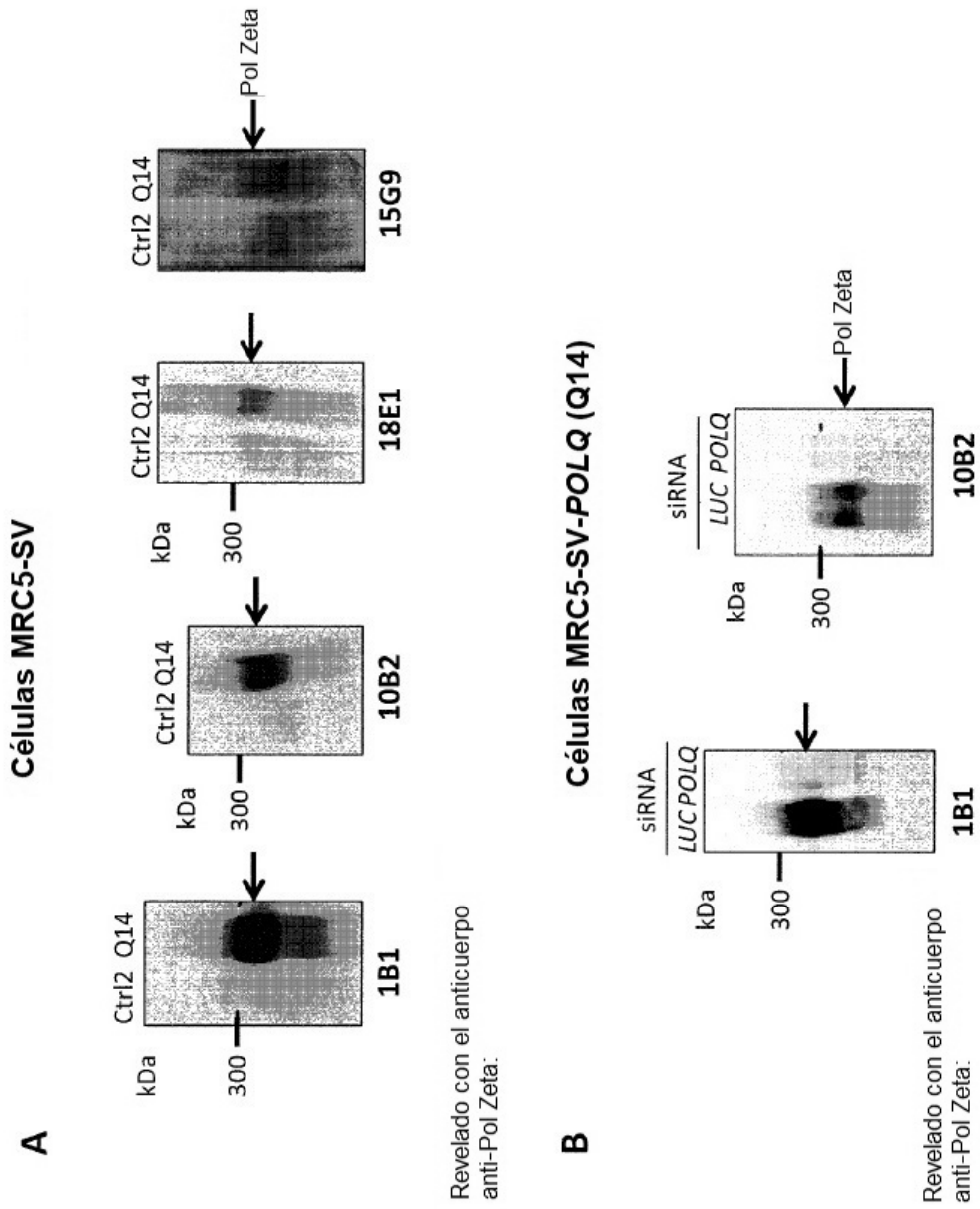
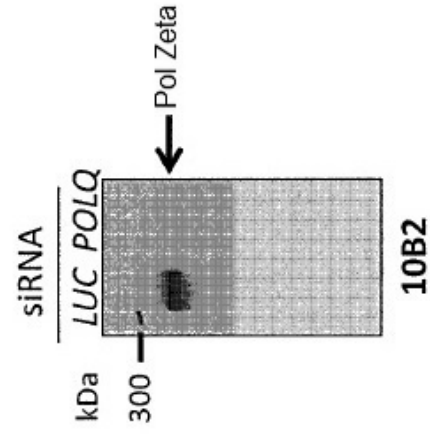
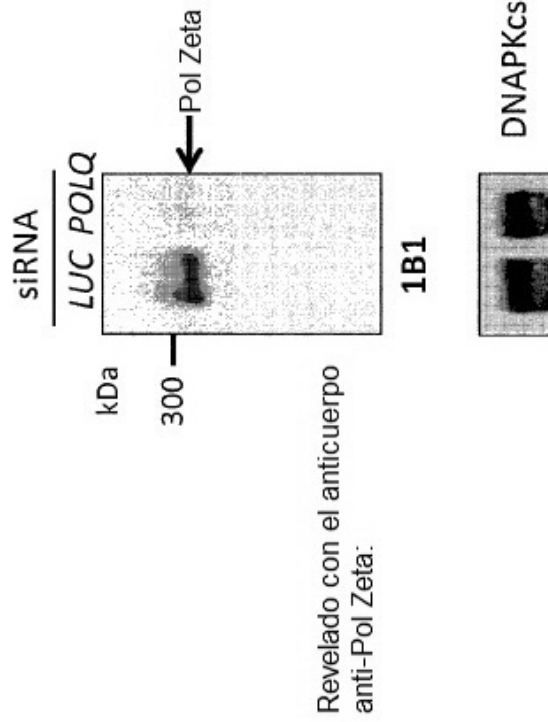


FIGURA 1

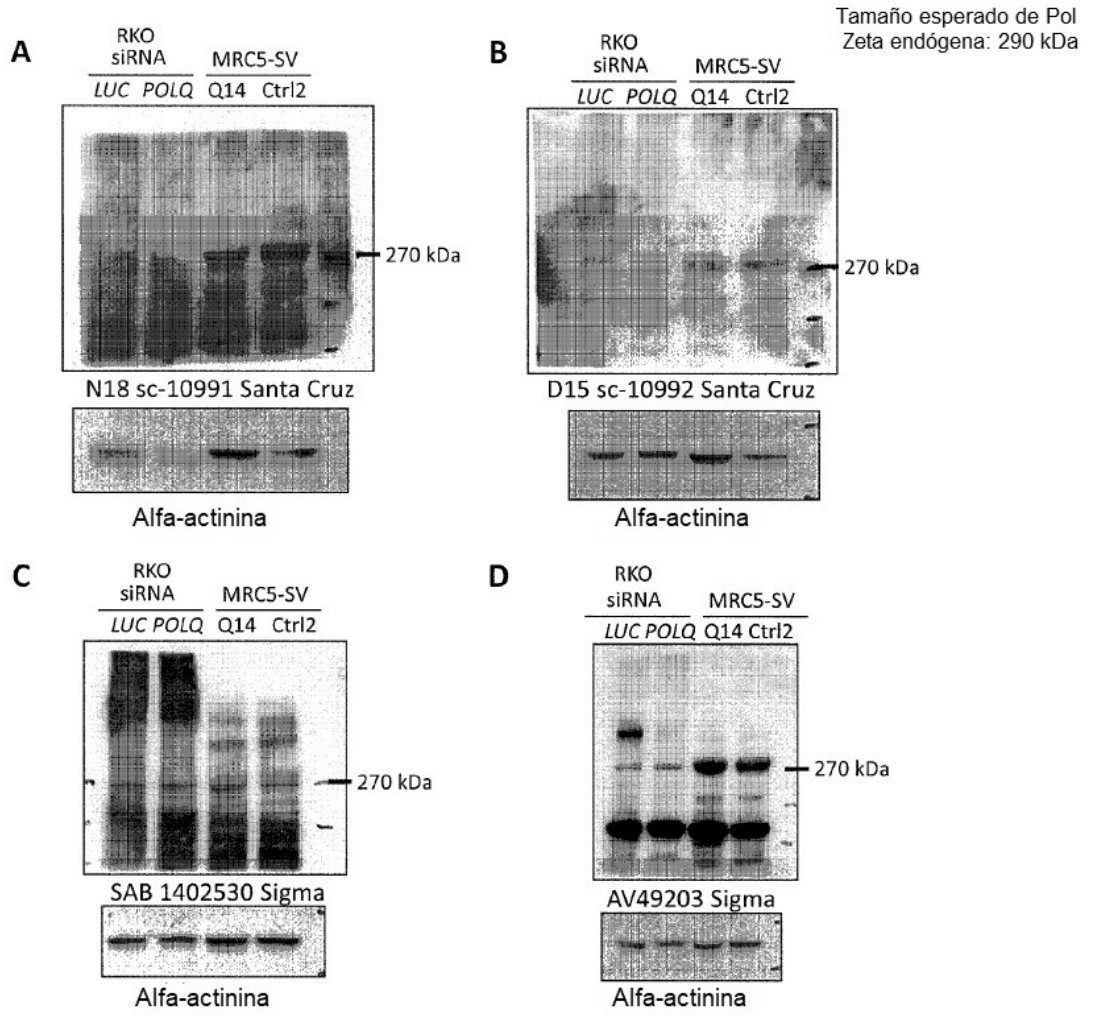
Tamaño esperado de Pol  
Zeta endógena: 290 kDa

**Células RKO**



**FIGURA 2**

FIGURA 3



MRC5-SV-POLQ (Q14)

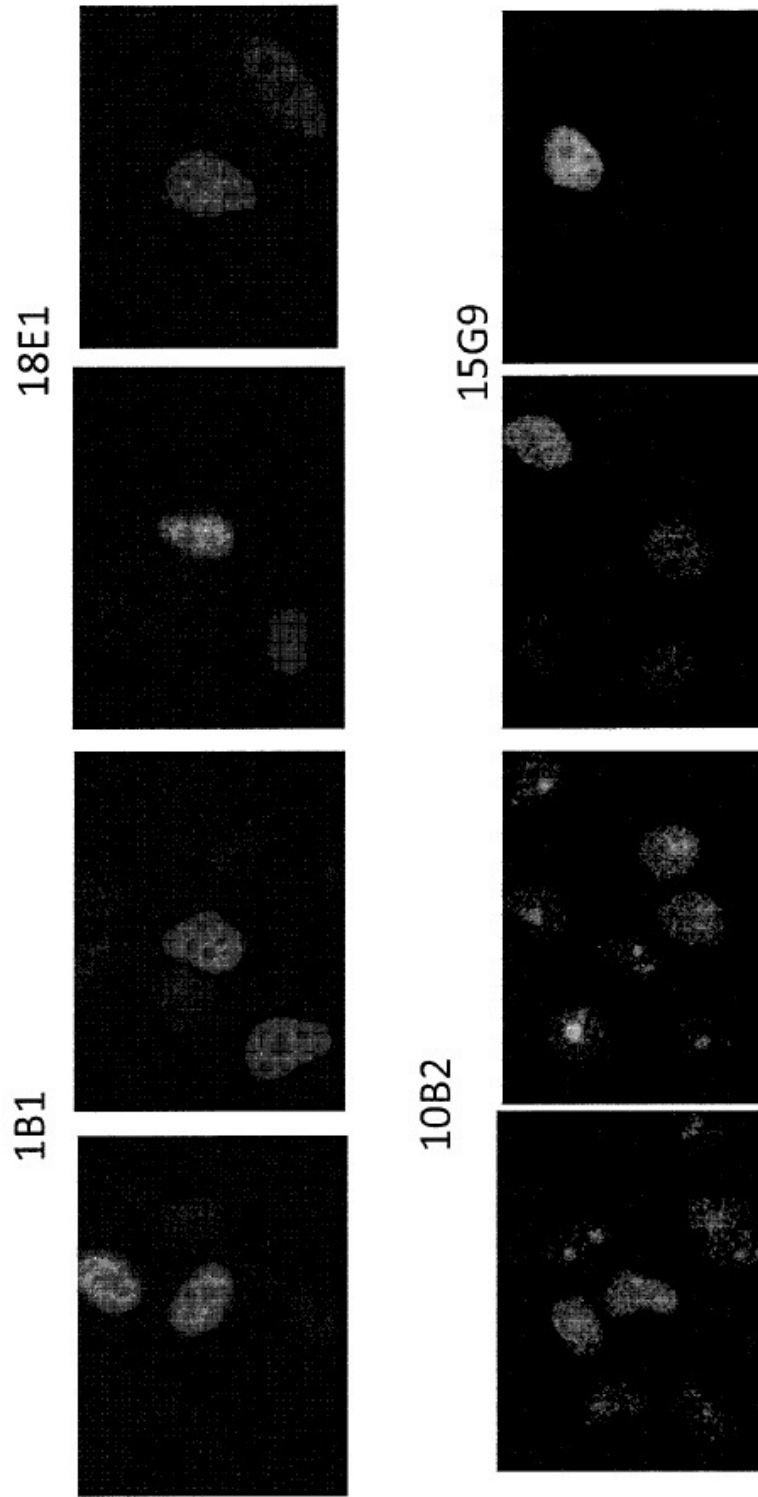
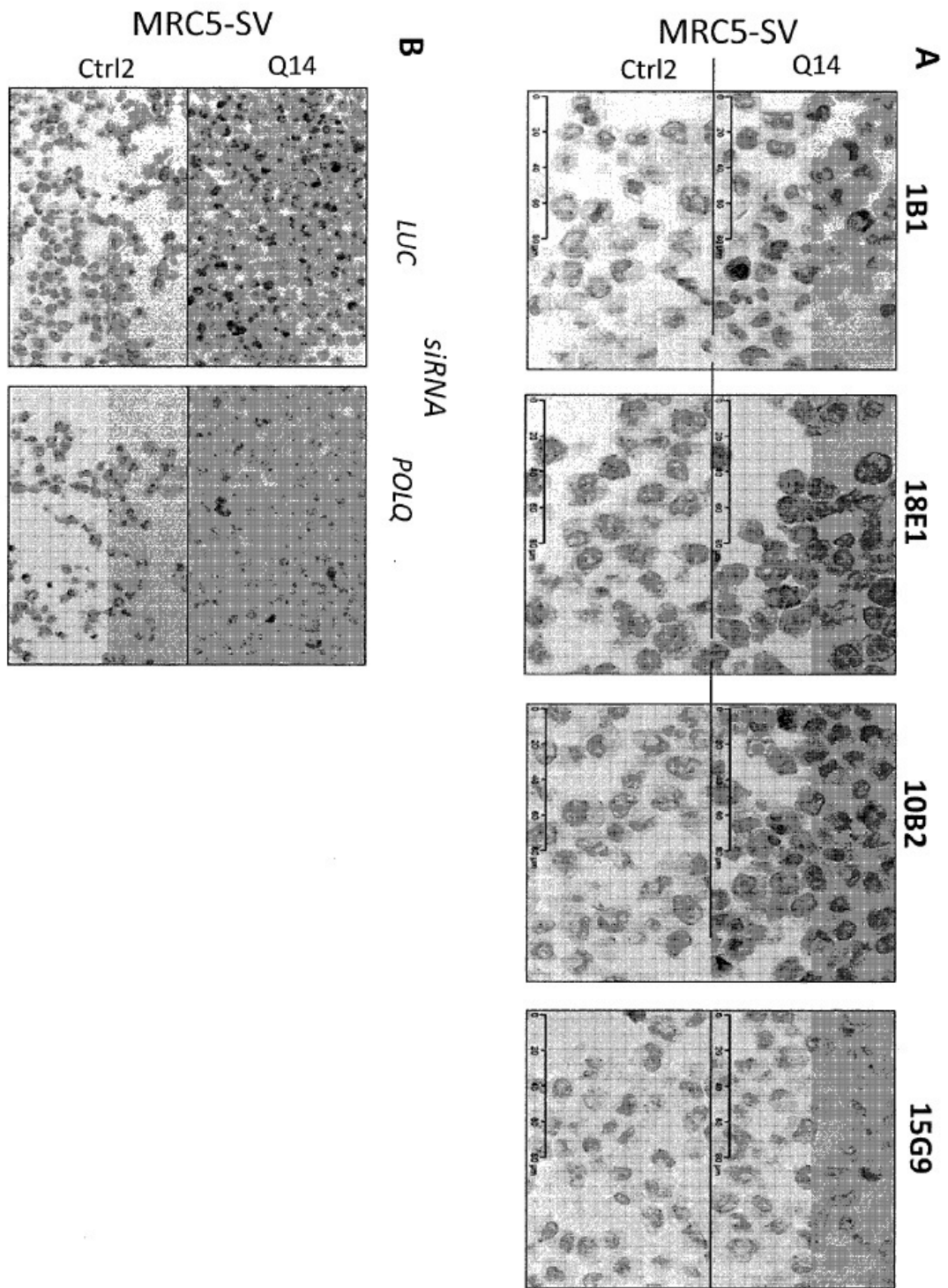
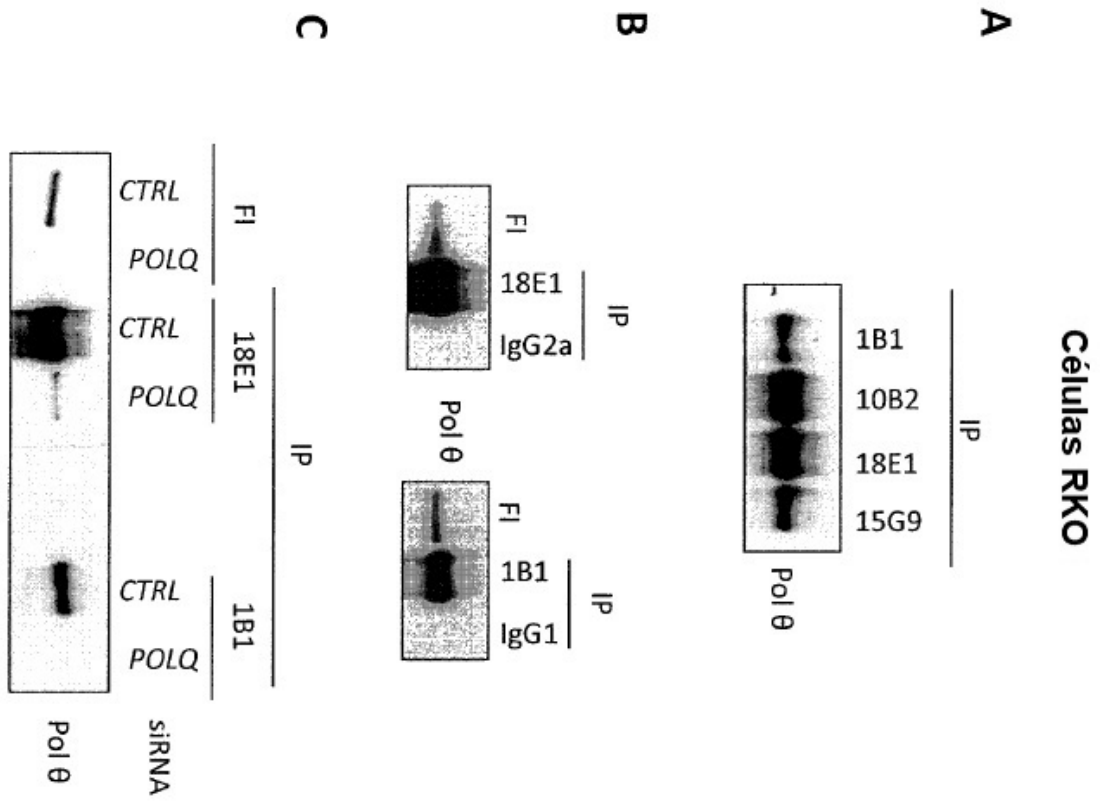


FIGURA 4

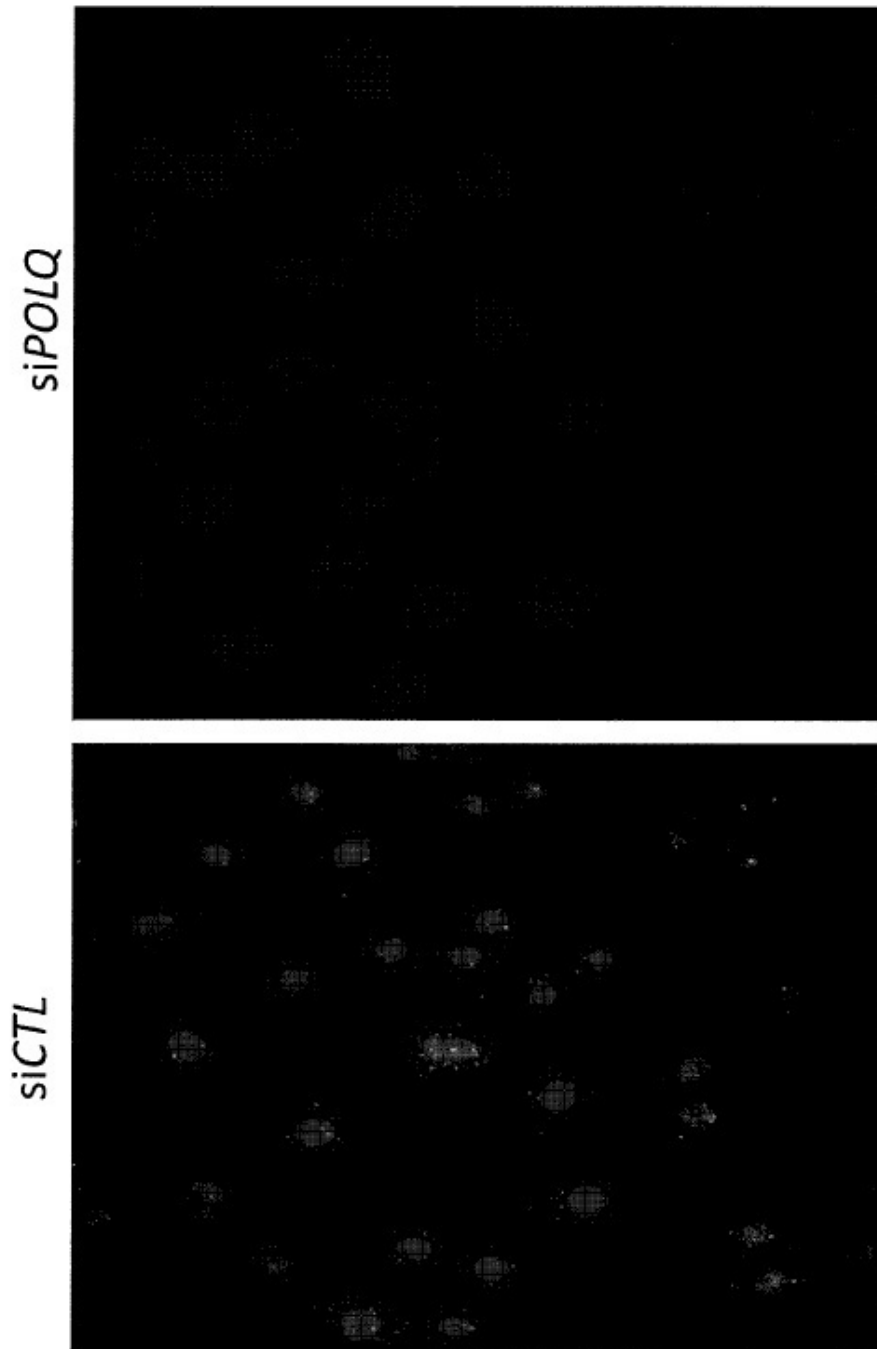


**FIGURA 5**





**FIGURA 6**



**FIGURA 7**

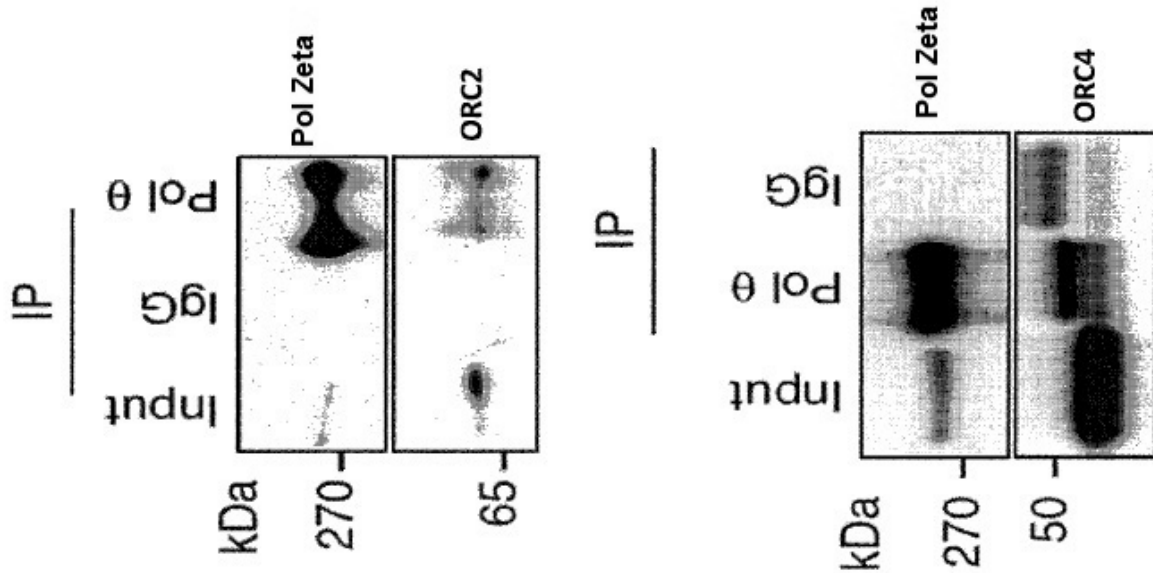


FIGURA 8