

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 719 624**

51 Int. Cl.:

C07K 14/00 (2006.01)

A61K 47/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2011 PCT/US2011/053064**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.03.2012 WO12040617**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2011 E 11827643 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2019 EP 2622091**

54 Título: **Peptidomiméticos de cáncer de colon y de páncreas**

30 Prioridad:

22.06.2011 WO PCT/US2011/041502

25.03.2011 US 201161467896 P

21.01.2011 US 201161435176 P

21.01.2011 US 201161435163 P

27.10.2010 US 407112 P

23.09.2010 US 385587 P

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

11.07.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

WANG, XUE-PING

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 719 624 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

Peptidomiméticos de cáncer de colon y de páncreas

Antecedentes de la invención

Biología molecular del cáncer

5 El cáncer es causado por un mal funcionamiento en los sistemas de control de crecimiento de una célula. Las células controlan su crecimiento mediante la combinación de inhibición de la proliferación por genes supresores de tumores (por ejemplo, proteína del retinoblastoma (pRb), p53) y activación de la proliferación por oncogenes (protooncogenes) (por ejemplo, RAS, WNT, MYC, EKR y TRK). Una mutación en un gen supresor de tumores y/o un protooncogén en una célula da como resultado tasas inusualmente altas de proliferación celular (por ejemplo, una célula tumoral).
10 Véase, Knudson (1971) Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 68 (4): 820-823. La célula puede mostrar signos tempranos de crecimiento aberrante, tal como una morfología aberrante o un tamaño inusualmente grande (hiperplasia). Las células tumorales también pueden proliferar a una tasa más alta de lo normal pero no letal, formando un crecimiento, conocido como tumor benigno (displasia). En las etapas posteriores del cáncer, las células tumorales proliferan a una tasa inusualmente alta que resulta en un crecimiento descontrolado que amenaza la salud del paciente conocido como tumores malignos (o cáncer *in situ*). Muchos tumores pueden "hacer metástasis" o diseminarse por todo el cuerpo formando tumores. La metástasis es generalmente un signo de etapa avanzada, el cáncer terminal. Weinberg (septiembre de 1996) "How Cancer Arises" Scientific American 62-70.

El cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal son los tres cánceres más comunes entre los hombres. El cáncer de pulmón, el cáncer de próstata, el cáncer de hígado y el cáncer colorrectal son las principales causas de muerte por cáncer entre los hombres. El cáncer de mama, el cáncer de pulmón y el cáncer colorrectal son las principales causas de muerte por cáncer entre las mujeres. Características de los CDC - Estadísticas de cáncer en los Estados Unidos (USCS) (2011). En la actualidad, existe una necesidad urgente de diagnósticos y terapias para el cáncer colorrectal, pancreático, prostático, pulmonar, hepático y de mama. Por ejemplo, cada año solo en los Estados Unidos, más de 43.000 personas son diagnosticadas con cáncer de páncreas. Instituto Nacional del Cáncer (2010) "What You Need to Know about Cancer of the Pancreas". Si bien se han logrado avances en la detección y el tratamiento del cáncer en las últimas dos décadas, las opciones actuales para la detección temprana y el tratamiento del cáncer son limitadas y existe una gran necesidad de nuevos métodos y materiales que proporcionen la detección y el tratamiento del cáncer, especialmente cáncer colorrectal y pancreático.

30 MUC5AC

Las mucinas son glicoproteínas de alto peso molecular con oligosacáridos enlazados a O unidos a residuos de serina o treonina de la cadena principal de la proteína apomucina expresados en un patrón específico de células y tejidos en tejidos normales. La familia de las mucinas incluye proteínas que contienen estructuras de repetición en tándem con una alta proporción de prolinas, treoninas y serinas (que constituyen el dominio PTS). Las mucinas se definen adicionalmente mediante la glicosilación extensa del dominio PTS a través de enlaces a través del enlace O-GalNAc en los residuos de treonina y serina. Cada mucina tiene una región central con un número variable de repeticiones en tándem con aproximadamente ocho residuos de aminoácidos, pero existe una pequeña similitud. Existen dos clases de mucinas estructuralmente y funcionalmente distintas: mucinas secretadas formadoras de gel y mucinas transmembrana. Las mucinas secretadas formadoras de gel incluyen los productos de los genes MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6. Véase Kocer, et al., (2006) BMC Gastroenterology 6: 4; véase también Hollingsworth y Swanson (2004) Nature Reviews 4: 45-60.

La familia de mucina humana (MUC) consiste en miembros designados como MUC1 hasta MUC21, subclasificados en formas secretadas y transmembrana. Las mucinas secretadas (por ejemplo, MUC2, MUC5AC, MUC5B y MUC6) forman una barrera física, que actúa como un gel mucoso que protege las células epiteliales que recubren el tracto respiratorio y gastrointestinal y forman las superficies ductales de órganos como el hígado, mama, páncreas y riñón. Las mucinas transmembrana (por ejemplo, MUC1, MUC4, MUC13 y MUC16) tienen una única región que se extiende sobre la membrana y contribuyen al gel mucoso protector a través de sus ectodominios de repeticiones en tándem O-glicosiladas que forman estructuras similares a barras. Kufe (2009) Nature Reviews 9: 874-885. La expresión de MUC5AC se encuentra en las células epiteliales apicales de las glándulas mucosas del antro y cuerpo gástrico, el epitelio traqueobronquial, el epitelio superficial de la vesícula biliar y el epitelio endocervical.

La MUC5AC se expresa altamente en adenoma. Véase Kocer, et al. (2006) BMC Gastroenterology 6: 4. Además, MUC5AC se expresa en tumores de origen gastrointestinal, pancreatobiliar y endocervical (por ejemplo, colon, esófago, hígado, pulmón, páncreas, estómago y útero). Véase Lau, et al. (2004) Am. J. Clin Pathol. 122: 61-69. La MUC5AC también es altamente expresada en cánceres de mama y gástricos. Zhang, et al., (1998) Clinical Cancer Research 4: 2669-2676. Además, las variantes de glicano de MUC5AC se han asociado con neoplasias pancreáticas. Haab, et al. (mayo 2010) Annals of Surgery 251 (5): 937-945. La MUC5AC se expresa aberrantemente por pólipos colorrectales y carcinoma colorrectal. Kocer, et al., (2006) BMC Gastroenterology 6 (4): 1-9. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de peptidomiméticos de epítipo de los mismos para uso en composiciones diagnósticas y

terapéuticas y métodos para tratar cáncer pancreático y colorrectal.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos de SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5).

5 La presente invención se relaciona con peptidomiméticos de un epítipo NPC-1 derivado de MUC5AC, incluidas las composiciones que los comprenden así como métodos de fabricación y uso.

En una realización, la invención proporciona una proteína de fusión aislada que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5). En otra realización, la proteína de fusión puede comprender una etiqueta detectable unida a la misma directa o indirectamente en forma covalente o no
10 covalente. En otra realización, la etiqueta detectable se puede seleccionar del grupo que consiste en etiqueta poliHis, etiqueta FLAG, MBP, proteína GST y GFP.

La invención también proporciona un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5), directa o indirectamente conjugada con un agente citotóxico, un agente terapéutico, etiqueta, carbohidrato, vehículo, inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, o un agente
15 inmunomodulador. En otra realización, el carbohidrato puede ser manosa, fucosa, glucosa, GlcNA o maltosa. En otra realización, el vehículo puede ser hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide de difteria, toxoide de cólera, ovoalbúmina, albúmina de suero bovino (BSA), exoproteína A de *Pseudomonas* o proteínas de la membrana externa microbiana (OMPS). En una realización adicional, el conjugado puede comprender un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5) conjugada con KLH. En otra realización, la etiqueta
20 puede ser una etiqueta quimioluminiscente, etiqueta paramagnética, agente de contraste para imágenes de resonancia magnética MRI, etiqueta fluorescente, etiqueta bioluminiscente o etiqueta radioactiva. En otra realización, la etiqueta paramagnética puede ser aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio. En otra realización, el agente citotóxico puede ser un fracción que inhibe la síntesis de ADN, ARN o proteínas, un radionúclido o una proteína inhibidora de ribosomas. En otra realización, el agente citotóxico puede ser ^{212}Bi , ^{131}I , ^{188}Re , ^{90}Y , vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antiviral de hierba carmesí, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de difteria, cadena de ricina A, o enzima citotóxica fosfolipasa.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende el polipéptido que comprende la secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. La composición puede ser una composición farmacéutica, una composición antigénica o una composición inmunogénica. En otra realización, la invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el polipéptido del kit está unido directa o indirectamente a un soporte de fase sólida o membrana celular. En otra
30 realización, el soporte de fase sólida puede ser una perla, placa, matriz, polímero, tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo o tira de prueba.

En una realización, la invención proporciona una composición que comprende una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo, adyuvante o excipiente aceptable para diagnóstico. La composición puede ser una composición farmacéutica, una composición antigénica o una composición inmunogénica. En otra realización, la invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el polipéptido del kit está unido directa o indirectamente a un soporte de fase sólida o membrana celular. En otra
40 realización, el soporte de fase sólida puede ser una perla, placa, matriz, polímero, tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo o tira de prueba. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una matriz. En una realización, la invención proporciona una composición que comprende un conjugado que comprende el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la composición comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo, adyuvante o excipiente aceptable para diagnóstico. La composición puede ser una composición farmacéutica, una composición antigénica o una composición inmunogénica. En otra realización, la invención proporciona un kit de diagnóstico que comprende un conjugado que comprende el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, el polipéptido del kit está unido directa o indirectamente a un soporte de fase sólida o membrana celular. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una perla, placa, matriz, polímero, tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo o tira de prueba. En otra realización, el soporte de fase sólida puede ser una matriz. En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la invención proporciona un vector de expresión aislado que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, una célula huésped aislada comprende un vector de expresión aislado que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En una realización adicional, un animal transgénico no humano puede comprender una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. La invención también proporciona una composición que puede comprender un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la composición puede comprender además un vehículo, adyuvante o excipiente
60

farmacéuticamente aceptable.

5 En una realización, la invención proporciona un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la invención proporciona un vector de expresión aislado que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, una célula huésped aislada comprende un vector de expresión aislado que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En una realización adicional, un animal transgénico no humano puede comprender una célula huésped que comprende un vector de expresión que comprende un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. La invención también proporciona una composición que puede comprender un polinucleótido aislado que codifica una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En otra realización, la composición puede comprender además un vehículo adyuvante o excipiente farmacéuticamente aceptable. La invención también proporciona un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 para uso en un método para tratamiento de cáncer. En otra realización, la invención también proporciona una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 para uso en un método para tratamiento de cáncer. En una realización adicional, la invención proporciona un conjugado que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 para uso en un método para tratamiento de cáncer. En otra realización, el cáncer puede seleccionarse del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, útero, esofágico, colorrectal e hígado. En una realización adicional, el cáncer es cáncer de páncreas o colorrectal.

10 En otra realización, se proporciona un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para hacer más lento el crecimiento de un tumor. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. se proporciona un porque quiero de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para promover la regresión tumoral en un sujeto. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En una realización, se proporciona un polipéptido de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para activar la inmunidad específica de antígeno. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

15 En una realización, se proporciona una proteína de ejecución de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para hacer más lento el crecimiento del tumor. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En una realización, se proporciona una proteína de fusión de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para promover la regresión tumoral en un sujeto. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. En una realización, se proporciona una proteína de fusión de acuerdo con las reivindicaciones para uso en un método para activar inmunidad específica de antígeno. El método puede comprender administrar una cantidad efectiva de una proteína de fusión que comprende un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

20 En otra realización, el polipéptido, la proteína de fusión, o el conjugado para uso en un método de tratamiento de cáncer, pueden administrarse en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina o un factor de crecimiento hematopoyético. El agente puede administrarse simultánea o secuencialmente con el anticuerpo. En otra realización, el cáncer puede ser cáncer de pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, útero, esofágico, colorrectal o de hígado. En una realización adicional, el cáncer es cáncer de páncreas o colorrectal. En aún otra realización, el cáncer puede ser cáncer de páncreas. En otra realización, el cáncer es cáncer colorrectal.

El cáncer puede ser un cáncer en etapa 1, 2, 3 o 4. El cáncer puede haber hecho metástasis. El paciente puede expresar niveles detectables de un epítipo NPC-1. El antígeno se puede detectar en una muestra de biopsia de tumor o en la sangre, heces, orina o fluido linfático. El paciente puede estar en riesgo de cáncer. El paciente puede ser un paciente sin síntomas.

25 En una realización, la invención proporciona un método para elaborar anticuerpos que comprende:

30 inmunizar un ratón con un polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, remover el bazo de dicho ratón y preparar una suspensión de células individuales, fusionar una célula de bazo con una célula de mieloma, cultivar las células después de la fusión en medio de selección de hibridoma, cultivar los hibridomas resultantes, cribar la producción de anticuerpos específicos y seleccionar los hibridomas que producen el anticuerpo deseado. En otra realización, la invención proporciona un método para elaborar anticuerpos que comprenden:

35 inmunizar un ratón con una proteína de fusión que comprende un polipéptido de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, remover dicho bazo del ratón y preparar una suspensión de células individuales, fusionar una célula de bazo con una célula de mieloma, cultivar las células después de la fusión en medio de selección de hibridoma, cultivar los hibridomas resultantes, cribar la producción de anticuerpos específicos y seleccionar hibridomas que

producen el anticuerpo deseado.

Breve descripción de las figuras

- La Figura 1 representa los resultados de la detección del antígeno NPC-1 en heces de pacientes con un resultado de colonoscopia normal, pólipos pequeños (SP), pólipos múltiples (MP), pólipos grandes (LP) y cáncer de colon (CC). Los resultados que se muestran en la Figura 1 sugieren una correlación entre el nivel de detección del antígeno NPC-1 en una muestra de heces con la presencia de pólipos y/o cáncer de colon, donde entre mayor es la cantidad de antígeno NPC-1 detectada, se correlaciona con pólipos más grandes o mayor cantidad de pólipos. Además, los datos sugieren más altos niveles de antígeno NPC-1 (por ejemplo, más de 20.000 unidades de antígeno NPC-1 en una muestra) como indicativo de cáncer de colon.
- La Figura 2A-B representa la detección de antígeno NPC-1 en pacientes con cáncer usando un anticuerpo NEO-101. La Figura 2A muestra un diagrama de dispersión de la detección de antígeno NPC-1 en pacientes con cáncer que se someten a tratamiento a 1 mes, 2 meses y 3 meses en comparación con los controles normales. Se analizaron muestras de sangre seriadas de pacientes con cáncer durante un período aproximado de 3 meses. El ELISA en sándwich NEO-101 se realizó con una dilución de suero 1:24. Los resultados se presentan como un diagrama de dispersión de cada grupo experimental, con la media y el error estándar de la media. Hubo 28 sueros normales, 41 sueros con cáncer de colon/páncreas a 1 mes, 33 sueros con cáncer de colon/páncreas a los 2 meses y 25 sueros con cáncer de colon/páncreas a los 3 meses. La Figura 2B muestra una gráfica de dispersión que muestra que los sueros con cáncer colorrectal y pancreático se detectan de manera similar por NEO-101. Las muestras de suero se clasificaron de acuerdo con pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal (n = 36) o pancreático (n = 5). Estos se compararon con el promedio de todas las muestras con cáncer y las muestras de suero normales.
- La Figura 3 representa la actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas AsPC-1 humano en ratones desnudos que comparan la administración de solución salina, IgG humana (200 µg) y NEO-101 (200 µg) que comprenden dos ciclos de tratamiento. Las flechas gruesas indican los días de inyección de NEO-101 (ip), las flechas delgadas indican los días de inyección de PBMC (ip), el asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los ratones tratados con NEO-101 y ratones tratados con IgG humana.
- La Figura 4 representa la actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas AsPC-1 humano en ratones desnudos que comparan la administración de solución salina, IgG humana (200 µg) y NEO-101 (200 µg) donde se administraron cuatro ciclos de tratamiento en vez de dos ciclos. Las flechas gruesas indican los días de inyección de NEO-101 (ip), las flechas delgadas indican los días de inyección de PBMC (ip), el asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los ratones tratados con NEO-101 y ratones tratados con IgG humana.
- La Figura 5 representa la actividad antitumoral en el modelo de xenoinjerto de tumor colorrectal LS174T humano en ratones desnudos que comparan la administración de solución salina, IgG humana (200 µg) y NEO-101 (200 µg). Las flechas gruesas indican los días de inyección de NEO-101 (ip), las flechas delgadas indican los días de inyección de PBMC (ip), el asterisco (*) indica diferencias estadísticamente significativas entre los ratones tratados con NEO-101 y ratones tratados con IgG humana.
- La Figura 6 representa los resultados de la secuenciación de péptidos después de varias rondas de bioselección de bibliotecas de fagos identificadas utilizando el anticuerpo NEO-101 y el anticuerpo antiidiotípico 4B6.
- La Figura 7 es un gráfico de barras que representa los resultados de clones de fagos en ELISA de NEO-101.
- La Figura 8A-B representa la inhibición de la unión a NEO-101 por clones del fago M13. La Figura 8A representa el porcentaje de inhibición de unión a NEO-101 por clones del fago M13. Los clones M13 se diluyeron 1:30 y compitieron NEO-101-biotina (250 ng/mL) en placas recubiertas con antígeno de cáncer de colon (3 µg/mL). En la Figura 8B, % de inhibición = $[\text{OD de NEO-101-biotina (250 ng/mL)} - \text{OD de NEO-101-biotina (250 ng/mL) + M13 diluido 1:30}] \div \text{OD de NEO-101-biotina (250 ng/mL)}$. La Figura 9B muestra la inhibición de unión de NEO-101 por clones M13 en placas recubiertas con antígeno de colon (3 µg/mL).
- La Figura 9A representa el porcentaje de inhibición de unión a NPC-1C por clones M13 en ELISA. Los clones M13 se derivaron de la bioselección que produjo 10^{11} pfu/10 µL. La Figura 9B es un gráfico de barras que representa la inhibición de unión de perlas con NPC-1C (%) por el fago clonado en el ensayo con perlas.
- La Figura 10 representa la unión del péptido a NEO-101 en un ensayo ELISA.
- La Figura 11 representa la unión del péptido-biotina a NEO-101.
- La Figura 12 es un gráfico de barras que representa el porcentaje de inhibición de la unión de los péptidos a NEO-101.
- La Figura 13 representa una comparación de las secuencias de aminoácidos del antígeno corto NPC-1 con los péptidos 4-1-3-C9 y 4-1-4-C12.
- La Figura 14A representa la unión de las células CFPAC1 por medio de perlas acopladas con anticuerpos, como un

porcentaje de inhibición de las perlas con NEO-101 que se unen a las células CFPAC1 (células con forma de roseta) inhibidas por los péptidos 4-1-4-C12 y 4-1-4C12. -R2. La Figura 14B es un gráfico de barras que muestra la inhibición por 4B6 de perlas con NEO-101 que se unen a células CFPAC1 (células con forma de roseta).

5 La Figura 15A es un gráfico de barras que muestra el porcentaje de bloqueo de NEO-101 por péptidos (identificados por bioselección en una biblioteca de fagos M13) en placas recubiertas con sobrenadante de cultivo de CFPAC1. La Figura 15B es un gráfico de barras de los valores de OD que muestran el bloqueo de NEO-101 por péptidos (identificado por bioselección en una biblioteca de fagos M13) en placas recubiertas con sobrenadante de cultivo CFPAC1.

10 La Figura 16A-B representa la unión de suero inmunizado con 4-1-4C12-KLH a 4-1-4C12 (SEQ ID NO: 5) (A) y el sobrenadante de la línea celular pancreática humana CFPAC1 (B) de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 17 representa que pAb anti 4-1-4C12 se une al sobrenadante de la línea celular pancreática humana CFPAC1, BSM y el péptido 4-1 -4C 12 de una manera dependiente de la dosis.

La Figura 18 representa que pAb anti 4-1-4C12 tiene menor afinidad por BSM cuando se compara con el anticuerpo NPC-1C en ELISA de unión.

15 Descripción detallada de la invención

Para que la invención descrita en este documento pueda entenderse completamente, se expone la siguiente descripción detallada. Varias realizaciones de la invención se describen en detalle y pueden ilustrarse adicionalmente mediante los ejemplos proporcionados.

Definiciones

20 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento pueden usarse en la invención o en el ensayo de la presente invención, los métodos y materiales adecuados se describen en el presente documento.

25 Como se usa en la presente descripción y a través de las reivindicaciones que siguen, el significado de "un", "uno, una" y "el, la" incluye una referencia al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

"Adyuvante", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier sustancia que se incorpore o se administre simultáneamente con el peptidomimético del epítipo NPC-1 de la invención que potencia la respuesta inmune en el sujeto. Los adyuvantes incluyen, entre otros, compuestos de aluminio, por ejemplo, geles, hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, y adyuvante completo o incompleto de Freund (por ejemplo, en el que el antígeno PS/A se incorpora en la fase acuosa de un agua estabilizada en una emulsión de aceite de parafina). El aceite de parafina se puede reemplazar con diferentes tipos de aceites, por ejemplo, aceite de escualeno o de cacahuete. Otros materiales con propiedades adyuvantes incluyen BCG (*Mycobacterium tuberculosis* atenuada), fosfato de calcio, levamisol, isoprinosina, polianiones (por ejemplo, poli A:U), lentinan, toxina pertussis, lípido A, saponinas, QS-21 y péptidos, por ejemplo, el dipéptido muramilo. Las sales de tierras raras, por ejemplo, lantano y cerio, también se pueden usar como adyuvantes. La cantidad de adyuvantes depende del sujeto y del antígeno particular usado y puede ser determinado fácilmente por un experto en la técnica sin excesiva experimentación.

30 "Aminoácido", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a los aminoácidos naturales y sintéticos, así como a los análogos de aminoácidos y a los miméticos de aminoácidos que funcionan de una manera similar a los aminoácidos naturales. Los aminoácidos naturales son aquellos codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido natural, es decir, un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfonio. Dichos análogos tienen grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero conservan la misma estructura química básica que un aminoácido natural. Los miméticos de aminoácidos se refieren a compuestos químicos que tienen una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de una manera similar a un aminoácido natural.

40 "Anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier estructura molecular que contiene una cadena polipeptídica con una forma específica que se adapta y reconoce un epítipo, donde una o más interacciones de unión no covalentes estabilizan el complejo entre la estructura molecular y el epítipo. La molécula de anticuerpo arquetípica es la inmunoglobulina, y todos los tipos de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgE, IgD, de todas las fuentes, por ejemplo, humanos, roedores, conejos, vacas, ovejas, cerdos, perros, pollos, se consideran "anticuerpos". Los anticuerpos incluyen, entre otros, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanos y otros anticuerpos de mamíferos no humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla (scFv), antianticuerpos de camello, nanocuerpos, IgNAR (anticuerpos de cadena sencilla derivados de tiburones), productos

inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂). Se han descrito numerosas secuencias codificantes de anticuerpos; y otros pueden plantearse por métodos bien conocidos en la técnica. Véase Streltsov, et al., (2005) *Protein Sci.* 14 (11): 2901-9; Greenberg, et al. (1995) *Nature* 374 (6518): 168-173; Nuttall, et al., (2001) *Mol Immunol.* 38 (4): 313-26; Hamers-Casterman, et al., (1993) *Nature* 363 (6428): 446-8; Gill, et al., (2006) *Curr Opin Biotechnol.* 17 (6): 653-8.

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

"Composición antigénica", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una composición que provoca una respuesta inmune.

"Cáncer", como se usa en este documento, se refiere en términos generales a cualquier enfermedad neoplásica (ya sea invasiva o metastásica) caracterizada por una división celular anormal e incontrolada que causa un crecimiento maligno o tumor.

"Anticuerpo quimérico", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una molécula de anticuerpo en la cual la región constante, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) está unida a una región constante de una clase diferente o alterada, función efectora y/o especie, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco; o la región variable, o una porción de la misma, se altera, reemplaza o intercambia con una región variable que tiene una especificidad de antígeno diferente o alterada.

"Variantes modificadas de manera conservadora", como se usa en el presente documento, se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como a las de ácido nucleico, y con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, se refiere en términos generales a las variantes modificadas de manera conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, con secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Tales variaciones de ácido nucleico son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en el presente documento que codifica un polipéptido también describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Un experto reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que normalmente es el único codón para metionina, y TGG, que normalmente es el único codón para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente idéntica.

"Región determinante de complementariedad", "región hipervariable" o "CDR", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una o más de las regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDR) encontradas en las regiones variables de cadenas ligeras o pesadas de un anticuerpo. Véase Kabat, et al., (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. Estas expresiones incluyen las regiones hipervariables definidas por Kabat, et al., (1983) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE. UU. o los bucles hipervariables en estructuras tridimensionales de anticuerpos. Chothia y Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917. Las CDR en cada cadena se mantienen muy cerca de las regiones marco y, con las CDR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno. Dentro de las CDR hay aminoácidos selectos que se han descrito como las regiones determinantes de selectividad (SDR) que representan los residuos de contacto críticos utilizados por la CDR en la interacción anticuerpo-antígeno. Kashmiri (2005) *Methods* 36: 25-34.

"Cantidad de control", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un marcador que puede ser cualquier cantidad o un rango de cantidades para comparar con una cantidad de prueba de un marcador. Por ejemplo, una cantidad de control de un marcador puede ser la cantidad de un marcador en un paciente con una enfermedad o condición particular o una persona sin tal enfermedad o condición. Una cantidad de control puede ser una cantidad absoluta (por ejemplo, microgramo/mL) o una cantidad relativa (por ejemplo, intensidad relativa de las señales).

"Presente en forma diferencial", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a las diferencias en la cantidad o calidad de un marcador presente en una muestra tomada de pacientes que tienen una enfermedad o condición en comparación con una muestra comparable tomada de pacientes que no tienen una de las enfermedades o afecciones. Por ejemplo, un fragmento de ácido nucleico puede estar presente opcionalmente de manera diferencial entre las dos muestras si la cantidad del fragmento de ácido nucleico en una muestra es significativamente diferente de la cantidad del fragmento de ácido nucleico en la otra muestra, por ejemplo, como se mide por ensayos de hibridación y/o basados en NAT. Un polipéptido está presente de manera diferencial entre las

dos muestras si la cantidad del polipéptido en una muestra es significativamente diferente de la cantidad del polipéptido en la otra muestra. Debe observarse que si el marcador es detectable en una muestra y no es detectable en la otra, entonces se puede considerar que dicho marcador está presente de manera diferencial. Opcionalmente, una cantidad relativamente baja de sobrerregulación puede servir como marcador.

5 "Diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a la identificación de la presencia o naturaleza de una condición patológica. Los métodos de diagnóstico difieren en su sensibilidad y especificidad. La "sensibilidad" de un ensayo de diagnóstico es el porcentaje de individuos enfermos que dan positivo (porcentaje de "positivos verdaderos"). Los individuos enfermos no detectados por el ensayo son "falsos negativos".
10 Los sujetos que no están enfermos y que tienen un resultado negativo en el ensayo se denominan "verdaderos negativos". La "especificidad" de un ensayo de diagnóstico es 1 menos la tasa de falsos positivos, donde la tasa de "falsos positivos" se define como la proporción de aquellos sin la enfermedad que dieron positivo. Si bien un método de diagnóstico particular puede no proporcionar un diagnóstico definitivo de una afección, es suficiente si el método proporciona una indicación positiva que ayude en el diagnóstico.

15 "Diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a clasificar una enfermedad o un síntoma, determinar una gravedad de la enfermedad, monitorear la progresión de la enfermedad, pronosticar un resultado de una enfermedad y/o perspectivas de recuperación. El término "detección" también puede abarcar opcionalmente cualquiera de los anteriores. El diagnóstico de una enfermedad de acuerdo con la presente invención puede, en algunas realizaciones, verse afectado por la determinación del nivel de un polinucleótido o un polipéptido de la presente invención en una muestra biológica obtenida del sujeto, en donde el nivel determinado puede
20 correlacionarse con la predisposición, o presencia o ausencia de la enfermedad. Se debe tener en cuenta que una "muestra biológica obtenida del sujeto" también puede comprender opcionalmente una muestra que no se ha extraído físicamente del sujeto.

25 "Cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a la cantidad de un compuesto, anticuerpo, antígeno o células que, cuando se administra a un paciente para tratar una enfermedad, es suficiente para efectuar dicho tratamiento para la enfermedad. La cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para la profilaxis y/o una cantidad efectiva para la prevención. La cantidad efectiva puede ser una cantidad efectiva para reducir, una cantidad efectiva para prevenir la incidencia de signos/síntomas, para reducir la gravedad de la incidencia de signos/síntomas, para eliminar la incidencia de signos/síntomas, para retardar el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, para prevenir el desarrollo de la incidencia de signos/síntomas, y/o efectuar la profilaxis de la incidencia de signos/síntomas. La "cantidad efectiva" puede variar de acuerdo con la enfermedad y su gravedad
30 y la edad, el peso, el historial médico, la susceptibilidad y las condiciones preexistentes del paciente a tratar. El término "cantidad efectiva" es sinónimo de "cantidad terapéuticamente eficaz" para los fines de esta invención.

35 "Vector de expresión", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier sistema de expresión recombinante con el propósito de expresar una secuencia de ácido nucleico de la invención *in vitro* o *in vivo*, constitutiva o induciblemente, en cualquier célula, incluyendo células procariotas, de levaduras, de hongos, de plantas, de insectos o de mamíferos. El término incluye sistemas de expresión lineales o circulares. El término incluye sistemas de expresión que permanecen episomales o se integran en el genoma de la célula huésped. Los sistemas de expresión pueden tener la capacidad de auto replicarse o no, es decir, conducir solo la expresión transitoria en una célula. El término incluye casetes de expresión recombinante que contienen solo los elementos mínimos necesarios
40 para la transcripción del ácido nucleico recombinante.

45 "Región marco" o "FR", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una o más de las regiones marco dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo. Véase Kabat, et al., (1987) "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Institutos Nacionales de la Salud, Bethesda, MD. Estas expresiones incluyen aquellas regiones de la secuencia de aminoácidos interpuestas entre las CDR dentro de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo.

50 "Heterólogo", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a porciones de un ácido nucleico que indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para producir un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región de codificación de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

55 "Alta afinidad", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un anticuerpo que tiene una KD de al menos 10^{-8} M, más preferiblemente al menos 10^{-9} M e incluso más preferiblemente al menos 10^{-10} M para un antígeno objetivo. Sin embargo, la unión de "alta afinidad" puede variar para otros isotipos de anticuerpos. Por ejemplo, la unión de "alta afinidad" para un isotipo IgM se refiere a un anticuerpo que tiene una KD de al menos 10^{-7} M, más preferiblemente al menos 10^{-8} M

"Homología", como se usa en este documento, se refiere en términos generales a un grado de similitud entre una secuencia de ácido nucleico y una secuencia de ácido nucleico de referencia o entre una secuencia de polipéptido y

una secuencia de polipéptido de referencia. La homología puede ser parcial o completa. La homología completa indica que las secuencias de ácido nucleico o de aminoácidos son idénticas. Una secuencia de ácido nucleico o aminoácido parcialmente homóloga es aquella que no es idéntica a la secuencia de ácido nucleico o aminoácido de referencia. El grado de homología se puede determinar por comparación de secuencia. El término "identidad de secuencia" se puede usar indistintamente con "homología".

"Célula huésped", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una célula que contiene un vector de expresión y apoya la replicación o expresión del vector de expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como células *E. coli* o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto (por ejemplo, SF9), de anfibio o de mamíferos tales como CHO, HeLa, HEK-293, por ejemplo, células cultivadas, explantes y células *in vivo*.

"Hibridación", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a la interacción física de cadenas de polinucleótidos complementarias (incluidas parcialmente complementarias) por la formación de enlaces de hidrógeno entre nucleótidos complementarios cuando las cadenas están dispuestas en forma antiparalela entre sí.

"Kasociación" o "Ka", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a la velocidad de asociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno, mientras que el término "Kdisociación" o "Kd", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno. El término "KD", como se usa en este documento, pretende referirse a la constante de disociación, que se obtiene a partir de la relación de Kd con Ka (es decir, Kd/Ka) y se expresa como una concentración molar (M). Los valores de KD para anticuerpos pueden determinarse usando métodos bien establecidos en la técnica.

"Inmunoensayo", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un ensayo que usa un anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno. El inmunoensayo se puede caracterizar por el uso de propiedades de unión específicas de un anticuerpo particular para aislar, atacar y/o cuantificar el antígeno.

"Aislado", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales al material removido de su entorno original en el que está presente en forma natural, y por lo tanto es alterado por acción humana a partir de su entorno natural. El material aislado puede ser, por ejemplo, ácido nucleico exógeno incluido en un sistema vectorial, ácido nucleico exógeno contenido dentro de una célula huésped o cualquier material que se haya removido de su entorno original y, por lo tanto, haya sido alterado por la mano del hombre (por ejemplo, "anticuerpo aislado o peptidomimético aislado").

"Etiqueta" o una "fracción detectable" como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos.

Condiciones de "rigurosidad baja", "rigurosidad media", "rigurosidad alta" o "rigurosidad muy alta", como se usan en este documento, se refiere en términos generales a las condiciones para la hibridación y lavado de ácidos nucleicos. La guía para realizar reacciones de hibridación se puede encontrar en Ausubel, et al. (2002) *Short Protocols in Molecules Biology* (5ª edición) John Wiley & Sons, NY. Los ejemplos de condiciones específicas de hibridación incluyen, entre otras, las siguientes: (1) condiciones de hibridación de baja rigurosidad en cloruro de sodio/citrato de sodio 6X (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido de dos lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados se puede aumentar hasta 55°C para condiciones de baja severidad); (2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguidas de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 60°C; (3) condiciones de hibridación de alta rigurosidad en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguidas de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1% a 65°C; y (4) condiciones de hibridación de rigurosidad muy alta son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido de uno o más lavados con 0,2X SSC, SDS al 1% a 65°C.

"Mamífero", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a todos y cada uno de los animales vertebrados de sangre caliente de la clase Mammalia, incluidos los seres humanos, caracterizados por una cobertura de pelo en la piel y, en las hembras, las glándulas mamarias productoras de leche. Para alimentar a los jóvenes. Los ejemplos de mamíferos incluyen, entre otros, alpacas, armadillos, capibaras, gatos, camellos, chimpancés, chinchillas, ganado, perros, jerbos, cabras, gorilas, hámsteres, caballos, humanos, lémures, llamas, ratones, primates no humanos, cerdos, ratas, ovejas, musarañas, ardillas y tapires. Los mamíferos incluyen, entre otros, especies de bovinos, caninos, equinos, felinos, murinos, ovinos, porcinos, primates y roedores. Los mamíferos también incluyen cualquiera y todos aquellos enumerados en la Especie de Mamíferos del Mundo mantenida por el Museo Nacional de Historia Natural, Instituto Smithsonian en Washington DC.

"Ácido nucleico" o "secuencia de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un oligonucleótido desoxirribonucleótido o ribonucleótido en forma de cadena sencilla o doble. El término abarca ácidos nucleicos, es decir, oligonucleótidos, que contienen análogos conocidos de nucleótidos naturales. El término también abarca estructuras similares a los ácidos nucleicos con cadenas principales sintéticas. A menos que se indique lo contrario, una secuencia particular de ácido nucleico también abarca implícitamente variantes modificadas conservadoramente de la misma (por ejemplo, sustituciones de codones degenerados) y secuencias complementarias, así como la secuencia explícitamente indicada. El término ácido nucleico se usa indistintamente con

gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido y polinucleótido.

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

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

10 "Paciente", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier animal que necesite tratamiento, ya sea para aliviar un estado de enfermedad o para prevenir la aparición o reincidencia de un estado de enfermedad. Además, "Paciente", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier animal que tenga factores de riesgo, antecedentes de enfermedad, susceptibilidad, síntomas, signos, fue previamente diagnosticado, corre el riesgo o es miembro de una población de pacientes para una enfermedad. El paciente puede ser un paciente clínico, tal como un paciente humano o veterinario, tal como un animal de compañía, domesticado, ganado, exótico o de zoológico. El término "sujeto" se puede usar indistintamente con el término "paciente".

15 "Peptidomimético", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un compuesto que puede imitar o bloquear el efecto biológico de un péptido a nivel molecular. Los peptidomiméticos pueden ser polímeros diseñados para imitar un péptido, tales como peptoides y péptidos β , o pueden ser un péptido que imita un péptido diferente.

20 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable y se refieren en términos generales a un polímero de residuos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un análogo o mimético de un aminoácido natural correspondiente, así como a los polímeros de aminoácidos naturales. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácidos son un mimético químico artificial de un aminoácido natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos naturales y polímeros de aminoácidos no naturales. Los polipéptidos pueden modificarse, por ejemplo, mediante la adición de residuos de carbohidratos para formar glicoproteínas. Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" incluyen glicoproteínas, así como no glicoproteínas.

25 "Promotor", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un arreglo de secuencias de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en este documento, un promotor incluye las secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden ubicarse a varios miles de pares de bases desde el sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que está activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que está activo bajo la regulación ambiental o de desarrollo.

30 "Cantidad profilácticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a la cantidad de un compuesto que, cuando se administra a un paciente para la profilaxis de una enfermedad o la prevención de la reincidencia de una enfermedad, es suficiente para efectuar dicha profilaxis para la enfermedad o recurrencia. La cantidad profilácticamente eficaz puede ser una cantidad eficaz para prevenir la incidencia de signos y/o síntomas. La "cantidad profilácticamente eficaz" puede variar según la enfermedad y su gravedad y la edad, el peso, el historial médico, la predisposición a las condiciones, las condiciones preexistentes, del paciente a tratar.

35 "Profilaxis", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un curso de terapia donde los signos y/o síntomas no están presentes en el paciente, están en remisión o estaban presentes previamente en un paciente. La profilaxis incluye la prevención de la enfermedad que ocurre después del tratamiento de una enfermedad en un paciente. Además, la prevención incluye el tratamiento de pacientes que potencialmente pueden desarrollar la enfermedad, especialmente pacientes que son susceptibles a la enfermedad (por ejemplo, miembros de una población de pacientes, aquellos con factores de riesgo o con riesgo de desarrollar la enfermedad).

40 "Recombinante" como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un producto, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se han modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva de una célula así modificada. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otra manera se expresan de manera anormal, expresados o no expresados en absoluto.

45 "Específicamente (o selectivamente) se une" a un anticuerpo o "específicamente (o selectivamente) inmunorreactivo con " o interactúa o se une específicamente, "como se usa en este documento, se refiere en términos generales a una proteína o péptido (u otro epitopo), se refiere, en algunas realizaciones, a una reacción de unión que es determinante de la presencia de la proteína en una población heterogénea de proteínas y otros compuestos biológicos. Por ejemplo,

bajo condiciones de inmunoensayo, los anticuerpos especificados se unen a una proteína particular al menos dos veces más que el fondo (señal no específica) y no se unen sustancialmente en una cantidad significativa a otras proteínas presentes en la muestra. Típicamente, una reacción específica o selectiva será al menos dos veces la señal o ruido de fondo y más típicamente más de aproximadamente 10 a 100 veces el fondo.

5 "Específicamente hibridables" y "complementarios" como se usa en este documento, se refieren en términos generales a que un ácido nucleico puede formar un enlace o enlaces de hidrógeno con otra secuencia de ácido nucleico ya sea por Watson-Crick tradicional u otros tipos no tradicionales. La energía libre de unión para una molécula de ácido nucleico con su secuencia complementaria es suficiente para permitir que la función relevante del ácido nucleico continúe, por ejemplo, la actividad de ARNi. La determinación de las energías libres de unión para las moléculas de
10 ácido nucleico es bien conocida en la técnica. Véase, por ejemplo, Turner, et al., (1987) CSH Symp. Cuant. Biol. LII: 123-33; Frier, et al., (1986) PNAS 83: 9373-77; Turner, et al., (1987) J. Am. Chem. Soc. 109: 3783-85. Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que puede formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, el emparejamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, aproximadamente al menos 5, 6, 7, 8, 9,10) de los 10 que son aproximadamente al
15 menos 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100% complementarios, inclusive). "Perfectamente complementario" o 100% de complementariedad se refiere en términos generales a todos los residuos contiguos de un enlace de hidrógeno de la secuencia de ácido nucleico con el mismo número de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácido nucleico. "Complementariedad sustancial" se refiere a las cadenas de polinucleótidos que exhiben aproximadamente al menos un 90% de complementariedad, excluyendo las regiones de las cadenas de polinucleótidos, tales como salientes, que se seleccionan de manera que no sean complementarias. La unión específica requiere un grado suficiente de complementariedad para evitar la unión no específica del compuesto oligomérico a las secuencias no objetivo en condiciones en las que se desea la unión específica, es decir, en condiciones fisiológicas en el caso de ensayos *in vivo* o tratamiento terapéutico, o en el caso de los ensayos *in vitro*, en las condiciones en que se realizan los ensayos. Las secuencias no objetivo típicamente pueden diferir en al menos 5 nucleótidos.

25 "Signos" de enfermedad, como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier anomalía indicativa de enfermedad, detectable en el examen del paciente; una indicación objetiva de enfermedad, en contraste con un síntoma, que es una indicación subjetiva de enfermedad.

"Soporte sólido", "soporte" y "sustrato", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier material que proporcione una estructura sólida o semisólida con la que se pueda unir otro material, incluidos, entre otros, soportes lisos (por ejemplo, metal, vidrio, plástico, silicio y superficies cerámicas), así como materiales texturados y porosos.

"Sujetos" como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a cualquier sujeto adecuado para ser tratada de acuerdo con la presente invención que incluye, pero no se limita a, sujetos aviares y mamíferos, y son preferiblemente mamíferos. Los mamíferos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, caninos, felinos, bovinos, caprinos, equinos, ovinos, porcinos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), lagomorfos, primates, humanos. Cualquier sujeto mamífero que necesite ser tratado de acuerdo con la presente invención es adecuado. Los sujetos humanos de ambos géneros y en cualquier etapa de desarrollo (es decir, neonato, lactante, juvenil, adolescente, adulto) pueden tratarse de acuerdo con la presente invención. La presente invención también puede llevarse a cabo en sujetos animales, particularmente en mamíferos tales como ratones, ratas, perros, gatos, vacas, cabras, ovejas y caballos con fines veterinarios, y con fines de detección y desarrollo de fármacos. "Sujetos" se usa indistintamente con "pacientes".

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

45 "Terapia", "terapéutica", o "tratamiento", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a tratar una enfermedad, detener o reducir el desarrollo de la enfermedad o sus síntomas clínicos, y/o aliviar la enfermedad, causando la regresión de la enfermedad o sus síntomas clínicos. La terapia abarca la profilaxis, el tratamiento, el remedio, la reducción, el alivio y/o mitigación de una enfermedad, signos y/o síntomas de una enfermedad. La terapia abarca un alivio de los signos y/o síntomas en pacientes con signos y/o síntomas de
50 enfermedad en curso (por ejemplo, crecimiento tumoral, metástasis). La terapia también abarca la "profilaxis". El término "reducido", con el propósito de terapia, se refiere en términos generales a la reducción clínica significativa en los signos y/o síntomas. La terapia incluye el tratamiento de recaídas o signos y/o síntomas recurrentes (por ejemplo, crecimiento tumoral, metástasis). La terapia abarca, entre otras cosas, excluir la aparición de signos y/o síntomas en cualquier momento, así como reducir los signos y/o síntomas existentes y eliminar los signos y/o síntomas existentes.
55 La terapia incluye el tratamiento de enfermedades crónicas ("mantenimiento") y enfermedades agudas. Por ejemplo, el tratamiento incluye tratar o prevenir las recaídas o la recurrencia de signos y/o síntomas (por ejemplo, crecimiento tumoral, metástasis).

"Región variable" o "VR", como se usa en este documento, se refiere en términos generales a los dominios dentro de cada par de cadenas ligeras y pesadas en un anticuerpo que están involucrados directamente en la unión del anticuerpo al antígeno. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de

dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera está alineado con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada.

- 5 "Vector", como se usa en el presente documento, se refiere en términos generales a un plásmido, cósmido, fagémido, ADN de fago u otra molécula de ADN que es capaz de replicarse de manera autónoma en una célula huésped, y que se caracteriza por uno o un pequeño número de sitios de reconocimiento de endonucleasas de restricción en los que dichas secuencias de ADN pueden cortarse de una manera determinable sin pérdida de una función biológica esencial del vector, y en la que se puede insertar ADN para lograr su replicación y clonación. El vector puede contener además un marcador adecuado para usar en la identificación de células transformadas con el vector.
- 10 Las técnicas y los procedimientos se realizan generalmente de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al., (2001) Molec. Cloning: Lab. Manual [3a Edición] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Se pueden usar técnicas estándar para el ADN recombinante, la síntesis de oligonucleótidos y el cultivo de tejidos, y la transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación pueden realizarse de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se realiza comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica descritas en este documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se pueden usar técnicas estándar para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes.

Variantes específicas de tumor de MUC5AC comprenden un epítipo NPC-1

- La presente invención describe peptidomiméticos de epítipos específicos de cáncer en MUC5AC que están específicamente unidos por los anticuerpos de la serie NEO-100 descritos en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401 (por ejemplo, NEO-101, NEO-102, NEO-103). Los peptidomiméticos descritos en este documento, SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵ (SEQ ID NO: 1), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y; SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵K (SEQ ID NO: 2), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y y SLEPEX¹DWX²FRYX³NY (SEQ ID NO: 3), en la que X¹ es E o D; X² es W o Y; y X³ es T o I; y los peptidomiméticos descritos en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 4-24, las imitaciones de epítipos expresadas por variantes específicas de tumor de un antígeno MUC5AC, incluidas las variantes de glicosilación. Estos peptidomiméticos pueden usarse en métodos para tratar y detectar cáncer, así como en la producción de anticuerpos específicos de tumores.

Forma variante específica del tumor de MUC5AC

- Una variante de glicosilación de MUC5AC es expresada por células tumorales. Esta variante de glicosilación puede ser debida a un defecto en enzimas transferasas u otras enzimas involucradas en la glicosilación. MUC5AC aislado del sobrenadante de CFPAC-1 (línea celular de cáncer de páncreas CFPAC-1) se digirió con termolisina y estos fragmentos (por ejemplo, las SEQ ID NOs: 27-33) están unidos por un anticuerpo NEO-101. Esto condujo al descubrimiento del epítipo NPC-1, como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401, que es un glicotipo específico de tumor dentro de la región de repetición en tándem de MUC5AC. Este análisis produjo un tramo de 15 residuos TTSTTSAPTTSTTSAP (SEQ ID NO: 34) que se superpone 100% con los péptidos generados a partir de la digestión con termolisina del constructo de MUC5AC. Esta región está enriquecida en prolina-treonina-serina y puede actuar como un andamio para el epítipo de carbohidrato aberrante reconocido por un anticuerpo NEO-100 (por ejemplo, NEO-101, NEO-102, NEO-103). Esto fue corroborado por estudios de eliminación de MUC5AC que sugieren que el tramo peptídico de GCPVTSTPVTAPSTP (SEQ ID NO: 35) se une a un anticuerpo NEO-100 (por ejemplo, NEO-101, NEO-102, NEO-103). Se cree que esta región actúa como un andamio para glicosilación aberrante en células tumorales, formando un patrón de glicoproteína aberrante que es reconocido por un anticuerpo NEO-100. El epítipo NPC-1 también es sensible al tratamiento con neuraminidasa pero no a otras enzimas (por ejemplo, β -glucosaminidasa, O-glicosidasa, PNGasa F, neuraminidasa ($\alpha 2 \rightarrow 3$), β ($1 \rightarrow 4$) galactosidasa).

- Usando la presentación en fagos peptídicos, se identificaron epítipos sintéticos que actúan como peptidomiméticos del glicotipo NPC-1: SX¹PXDX³FRYX⁴NX⁵ (SEQ ID NO: 1), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y; SX¹PXDX³FRYX⁴NX⁵K (SEQ ID NO: 2), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y y SLEPEX¹DWX²FRYX³NY (SEQ ID NO: 3), en la que X¹ es E o D; X² es W o Y; y X³ es T o I; y los peptidomiméticos descritos en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4-24. No existe una homología significativa entre las secuencias peptídicas y la secuencia de MUC5AC, lo que sugiere que los péptidos comprenden peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Es probable que tales peptidomiméticos sean un glicomimético de la glicosilación aberrante expresada por las células tumorales pero no por los tejidos normales de colon o páncreas. Esto puede ser útil como una etiqueta en ensayos de diagnóstico o un péptido de control para medir la unión del anticuerpo NEO-101. Además, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden usarse en métodos de diagnóstico o terapéuticos para el cáncer de colon, páncreas, estómago, ovario, pulmón, mama o esófago.

Como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401, las variantes de glicosilación de

MUC5AC se correlacionan con células tumorales y han caracterizado antígenos MUC5AC específicos de tumores (por ejemplo, epítomos o determinantes antigénicos) que pueden usarse en métodos terapéuticos y diagnóstico (por ejemplo, tratamiento de cáncer que involucra antígenos MUC5AC específicos del tumor y la detección de antígenos variantes de MUC5AC específicos del tumor). Los estudios de inmunohistoquímica demuestran que el epítomo NPC-1 puede ser útil como biomarcador tisular de presencia y progresión de cáncer de colon, páncreas, estómago, ovario, pulmón, mama o esófago. Por ejemplo, los anticuerpos dirigidos al epítomo NPC-1 pueden inhibir la progresión del tumor. Además, los niveles de epítomo NPC-1 detectados en los sueros parecen aumentar a medida que el cáncer progresa, por lo que el NPC-1 puede usarse como un marcador de diagnóstico no invasivo para el cáncer de colon, páncreas, estómago, ovario, pulmón, mama o esófago. Por lo tanto, el peptidomimético del epítomo NPC-1 descrito en el presente documento se puede utilizar como un objetivo diagnóstico y terapéutico específico para el cáncer de colon, páncreas, estómago, ovario, pulmón, mama o esófago.

Anticuerpo Monoclonal NEO-1

Como se describe en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401, los anticuerpos NEO-100 (por ejemplo, NEO-101, NEO-102, NEO-103) se unen a las células tumorales e inician la citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC) en esta célula y/o inhibe la proliferación celular. Por ejemplo, un anticuerpo NEO-101 se produjo mediante la técnica de hibridoma, se clonó, se quimerizó con regiones constantes humanas y también completamente humanizadas. Los inventores sorprendentemente descubrieron que el epítomo NPC-1 está contenido dentro de las regiones de repetición en tándem (TR) de la glicoproteína MUC5AC y que un anticuerpo NEO-100 reconoce una forma aparentemente aberrantemente glicosilada de MUC5AC expresada por células tumorales. Esto está en contraste con otros anticuerpos anti-MUC5AC (por ejemplo, 1-13M1, SOMU1, 463M) que se unen predominantemente cerca de la región del extremo terminal N o el extremo terminal C y no un glicótomo en las regiones de repetición en tándem. Véase la Tabla 1. Además, el epítomo NPC-1 es sensible a las enzimas glicolíticas y, por lo tanto, sugiere que es un glicótomo. Adicionalmente, ninguno de los anticuerpos disponibles comercialmente contra MUC5AC que fueron probados por los inventores se encontró que reaccionan de forma cruzada con la unión por NPC-1. Usando estos anticuerpos, los inventores aislaron un peptidomimético que se une al anticuerpo NEO-101 pero no comparte ninguna homología significativa con el epítomo NPC-1.

Tabla 1

Clon de anticuerpo	Fuente	Sitio de unión	¿Compite con el anticuerpo NEO-1?
45M1	Abcam Inc.	No caracterizado	No
H00004586	Abnova Inc.	Últimos 100 residuos en el terminal carboxilo	No
CLH-2	Millipore Inc.	Repetición en tándem	No
2-11M1	Abcam Inc.	Terminal amino	No
9-13M1	Abcam Inc.	Terminal amino	No
1-13M1	Abcam Inc.	Región TSP-1 Cys-2	No
2-12M1	Abcam Inc.	Región terminal carboxilo	No
Conejo policlonal (H-160)	Santa Cruz Biotechnology Inc.	Residuos 1214-1373	No

La actividad de unión a células tumorales de NEO-101 se realizó mediante citometría de flujo usando líneas celulares tumorales colorrectales y pancreáticas. Como se muestra en la Tabla 2, el anticuerpo NEO-101 reaccionó con una muestra de líneas celulares de tumores colorrectales y pancreáticos humanos. Un anticuerpo de control de isotipo no reaccionó con las células tumorales colorrectales y pancreáticas, lo que demuestra la reactividad específica de antígeno de NEO-101 con estas líneas celulares tumorales colorrectales y pancreáticas. Véase la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401

Tabla 2: Citometría de flujo: unión de células tumorales por NEO-101

Línea de células tumorales	% de células teñidas (mfi)	
	Control de isotipo	NEO-101

Colorrectal LS174T	3,85 (35)	89,72 (103)
Colorrectal Colo-205	2,33 (34)	94,67 (175)
Colorrectal SW480	3,38 (56)	58,98 (118)
Pancreática CFPAC-1	1,79 (25)	52,56 (59)

5 La Tabla 3 muestra que 43% de los cánceres de colon y 48% de los cánceres de páncreas se tiñeron positivamente con el anticuerpo NEO-101. Se observó que solo una de las cuatro muestras de colon normal mostró una positividad moderada con NEO-101. Además, en ciertos casos en los que el tejido del colon normal se tiñó positivamente con NEO-101, se descubrió que el tejido se había extirpado quirúrgicamente de regiones adyacentes al cáncer de colon. En consecuencia, los tejidos "normales" teñidos positivamente ya pueden haber sufrido cambios genotípicos ("precancerosos") que dan como resultado la expresión del antígeno MUC5AC aberrantemente glicosilado que podría conducir a la detección de carcinoma con NEO-101.

Tabla 3: Inmunohistoquímica: tejidos humanos con NEO-101 biotinilado

Muestra de tejido humano (Fuente)	Intensidad de tinción del tejido						
	Negativa	Débil	+1	+2	+3	+4	Positivo total
Cáncer de colon	27/48 (56%)	5/48 (10%)	7/48 (15%)	4/48 (8%)		5/48 (10%)	21/48 (43%)
Colon normal	3/4 (75%)			1/4 (25%)			1/4 (25%)
Cáncer de páncreas	56/108 (52%)		17/108 (16%)	7/108 (6%)	18/108 (17%)	10/108 (9%)	52/108 (48%)
Páncreas normal	3/3 (100%)						0/3 (0%)
Cáncer de útero	32/42 (76%)			2/42 (5%)	8/42 (19%)		10/42 (24%)
Útero normal	12/12 (100%)						0/12 (0%)
Cáncer de próstata	30/40 (75%)		5/40 (12%)	5/40 (12%)			10/40 (25%)
Próstata normal	4/4 (100%)						0/4 (0%)

10 La tinción con un anticuerpo de control de isotipo IgG1 humano no mostró reactividad frente a los mismos tejidos. Los estudios inmunohistoquímicos demuestran la tinción de tejido NEO-101 en tejido de adenocarcinoma pancreático y carece de tinción en tejido pancreático normal.

15 En resumen, los resultados de tinción de anticuerpos con NEO-101 demostraron inmunorreactividad específica con los tejidos cancerosos de los pacientes de colon y páncreas, mientras que solo se observó una unión débil en el páncreas normal o en los tejidos de colon. Además, no se observó reactividad cruzada en otros tejidos humanos normales teñidos, lo que indica una fuerte correlación positiva de la unión de NEO-101 a los tejidos de cáncer de colon y páncreas. Por lo tanto, el epítipo NPC-1 es expresado por células tumorales de colon y páncreas, pero no por células tumorales páncreas o de colon normal. Por lo tanto, el epítipo NPC-1 se puede usar como un marcador específico del tumor o un objetivo terapéutico para el cáncer de colon y pancreático. Además, los peptidomiméticos del epítipo NPC-

20

1 (por ejemplo, el polipéptido de las SEQ ID NOs: 1-24) como se describe en el presente documento se pueden usar en la detección y tratamiento de cáncer (por ejemplo, de colon, páncreas, mama, pulmón, ovario, estómago, esófago).

Peptidomiméticos del epítipo NPC-1

5 La invención proporciona peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de acuerdo con las reivindicaciones. Los inventores sorprendentemente descubrieron que MUC5AC comprende al menos un epítipo NPC-1. Los ejemplos de polipéptidos que comprenden al menos un epítipo NPC-1 se proporcionan en GCPVTSTPVTAPSTP (SEQ ID NO: 35). Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden comprender las siguientes secuencias: SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵ (SEQ ID NO: 1), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y; SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵K (SEQ ID NO: 2), en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y y SLEPEX¹DWX²FRYX³NY (SEQ ID NO: 3), en la que X¹ es E o D; X² es W o Y; y X³ es T o I; FPEDYFRYTNQK (SEQ ID NO: 4); SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5); y los peptidomiméticos descritos en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 6-24.

15 Los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos que comprenden al menos un peptidomimético del epítipo NPC-1 pueden modificarse usando técnicas estándar de biología molecular que dan como resultado variantes de polipéptidos que comprenden al menos un epítipo NPC-1 que incluyen, entre otros, supresiones, adiciones y sustituciones en la secuencia de aminoácidos, que conserva la antigenicidad específica del epítipo NPC-1 (por ejemplo, el epítipo NPC-1 está unido por el anticuerpo NEO-1). Además, las variantes de polipéptidos que comprenden al menos un epítipo NPC-1 también pueden retener la antigenicidad de un epítipo NPC-1 (por ejemplo, genera una respuesta inmune específica contra los epítopos NPC-1 respectivamente, tras la inmunización en un sujeto). Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden formularse con un vehículo farmacéutico para fabricar una composición de antígeno útil como "vacuna contra el cáncer" (por ejemplo, una composición farmacéutica que provoca una respuesta inmunitaria específica contra el epítipo NPC-1, que produce anticuerpos antitumorales después de la inmunización en un sujeto). Por ejemplo, una vacuna contra el cáncer puede comprender una composición que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-24, o combinaciones de las mismas. Una vacuna contra el cáncer puede comprender una composición que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 o 5 y un adyuvante o portador farmacéutico. Además, una vacuna contra el cáncer puede comprender una composición que comprende un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 4 o 5 conjugadas a un vehículo tal como KLH. El peptidomimético del epítipo NPC-1 puede ser un péptido pequeño. Además, la estructura peptídica del peptidomimético que puede tener una estructura química alterada está diseñada para mejorar la estabilidad o la actividad biológica. Tales modificaciones incluyen cadenas principales alteradas y la incorporación de aminoácidos no naturales.

Derivados y análogos de polipéptidos

35 Se apreciará que los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en este documento pueden ser polipéptidos, productos de degradación, péptidos sintéticos o péptidos recombinantes, así como peptidomiméticos, péptidos sintéticos, peptoides y semipeptoides (por ejemplo, análogos de péptidos, que pueden tener, por ejemplo, modificaciones que hacen que los péptidos sean más estables mientras están en un cuerpo o más capaces de penetrar en las células). Las modificaciones de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1, descritas en el presente documento incluyen, pero no se limitan a modificación del extremo terminal N, modificación del extremo terminal C, modificación del enlace peptídico (por ejemplo, CH₂-NH, CH₂-S, CH₂-S=O, O=C-NH, CH₂-O, CH₂-CH₂, S=C-NH, CH=CH o CF=CH), modificaciones de la cadena principal y modificación de residuos. Los métodos para preparar compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica. Martin (2010) Quantitative Drug Design: A Critical Introduction [2a Edición] CRC Press.

45 Los enlaces peptídicos (-CO-NH-) dentro del péptido pueden ser sustituidos, por ejemplo, por enlaces N-metilados (-N(CH₃)-CO-), enlaces éster (-C(R)H-C-O- O=C(R)-N-), enlaces cetometileno (-CO-CH₂-), enlaces α -aza (-NH-N(R)-CO-), en los que R es cualquier alquilo, por ejemplo, enlaces metilo, enlace carba (-CH₂-NH-), enlaces hidroxietileno (-CH(OH)-CH₂-), enlaces de tioamida (-CS-NH-), enlaces olefínicos dobles (-CH=CH-), enlaces retro amida (-NH-CO-), derivados peptídicos (-N(R)-CH₂-CO-), en los que R es la cadena lateral "normal", naturalmente presente en el átomo de carbono. Estas modificaciones pueden ocurrir en cualquiera de los enlaces a lo largo de la cadena peptídica e incluso en varias (2-3) al mismo tiempo.

50 Los aminoácidos aromáticos naturales, Trp, Tyr y Phe, pueden estar sustituidos por aminoácidos no naturales sintéticos como fenilglicina, TIC, naftilelanina (Nol), derivados de fenilalanina metilados en el anillo, derivados halogenados de fenilalanina o metil tirosina. Además de lo anterior, los polipéptidos de la presente invención también pueden incluir uno o más aminoácidos modificados o uno o más monómeros que no son aminoácidos (por ejemplo, ácidos grasos, carbohidratos complejos), por ejemplo, hidroxiprolina, fosfoferina y fosfotreonina; y otros aminoácidos inusuales que incluyen, entre otros, ácido 2-aminoadípico, hidroxilisina, isodesmosina, norvalina, norleucina y ornitina. Además, el término "aminoácido" incluye tanto aminoácidos D como L.

Los polipéptidos pueden comprender uno o más aminoácidos polares no naturales o naturales, que incluyen pero no se limitan a Serina y treonina que son capaces de aumentar la solubilidad del péptido debido a su cadena lateral que contiene hidroxilo.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la presente invención pueden estar en forma lineal, aunque se apreciará que también pueden utilizarse formas circulares.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden purificarse a partir de células que se han alterado para expresarlos (por ejemplo, recombinante). Las secuencias de ADN que codifican los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden insertarse en un vector de expresión y luego transformarse (o transfectarse) en una célula huésped apropiada y/o expresarse en un animal transgénico. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 así expresados se pueden aislar luego por métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Edición] Cold Spring Harbor Laboratory Press. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la presente invención pueden ser sintetizados bioquímicamente mediante el uso de técnicas estándar en fase sólida. Estos métodos incluyen síntesis exclusiva en fase sólida, métodos de síntesis parcial en fase sólida, condensación de fragmentos, síntesis clásica en solución. Los procedimientos de síntesis de péptidos en fase sólida son bien conocidos en la técnica y se describen adicionalmente por Stewart (1984) *Solid Phase Peptide Syntheses* [2a Edición] Pierce Chemical Company y Benoiton (2005) *Chemistry of Peptide Synthesis* CRC Press. Los péptidos sintéticos pueden purificarse mediante cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento y cuya composición puede confirmarse mediante secuenciación de aminoácidos. Véase Creighton (1992) [2a Edición] *Proteins, Structures and Molecular Principles* W.H. Freeman y compañía; Aguilar (2004) [Ed.] *HPLC of Peptides and Proteins: Methods and Protocols* Humana Press; Simpson (2002) *Protein Sequencing Protocols* [2a Ed.] Humana Press.

En los casos en que se desean grandes cantidades de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la presente invención, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la presente invención se pueden generar utilizando técnicas recombinantes como las descritas por Invitrogen (2002) "Guide to Baculovirus Expression Vector Systems (BEVs) y Insect Culture Techniques" *Instruction Manual*; Hatti-Kaul y Mattiasson (2003) [Eds] *Isolation and Purification of Proteins*; Ahmed (2004) *Principles and Reactions of Protein Extraction, Purification and Characterization* CRC Press. Además técnicas recombinantes tales como las descritas por, por ejemplo, Bitter, et al. (1987) *Methods in Enzymol.* 153: 516-544, Studier, et al., (1990) *Methods in Enzymol.* 185: 60-89, Brisson, et al., (1984) *Nature* 310: 511-514, Takamatsu, et al., (1987) *EMBO J.* 6: 307-311, Coruzzi, et al. (1984) *EMBO J.* 3: 1671-1680 y Brogli, et al., (1984) *Science* 224: 838-843, Gurley, et al., (1986) *Mol. Cell. Biol.* 6: 559-565 y Weissbach & Weissbach (1988) *Methods for Plant Molecular Biology*, Academic Press, NY, Sección VIII, páginas 421-463.

Variantes de secuencia de polipéptidos

Para cualquier secuencia peptidomimética del epítipo NPC-1 descrita en el presente documento, se puede lograr una caracterización u optimización adicional mediante la adición o eliminación sistemática de residuos de aminoácidos para generar péptidos más largos o más cortos, y probándolos y las secuencias generadas al desplazar una ventana de mayor o menor tamaño hacia arriba o hacia abajo del antígeno a partir de ese punto. La combinación de este enfoque para generar nuevos objetivos candidatos probando la efectividad de las moléculas antigénicas con base en esas secuencias en un ensayo de inmunogenicidad, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento, puede conducir a una manipulación adicional del antígeno. Aún adicionalmente, tales secuencias optimizadas pueden ajustarse, por ejemplo, mediante la adición, supresiones u otras mutaciones conocidas en la técnica y/o discutidas en el presente documento para optimizar aún más el peptidomimético del epítipo NPC-1 (por ejemplo, aumentar la estabilidad en suero o la semivida en circulación, aumentar la estabilidad térmica, mejorar el suministro, mejorar la inmunogenicidad, aumentar la solubilidad, el direccionamiento a una ubicación particular *in vivo* o tipo de célula).

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden comprender mutaciones de sustitución conservadora, (es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, una sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido con otro dentro de la misma clase general, por ejemplo, un aminoácido ácido con otro aminoácido ácido, un aminoácido básico con otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro.

Las secuencias peptidomiméticas del epítipo NPC-1 pueden tener al menos aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% de homología de secuencia con cualquiera de al menos una de las secuencias polipeptídicas de las SEQ ID NOs: 1-24. Además, la variante de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descrita en este documento puede conservar la antigenicidad de la secuencia de la que se derivó. Se describen secuencias polipeptídicas que tienen al menos aproximadamente 95% de homología de secuencias, tal como al menos aproximadamente 98% de homología de secuencias, o al menos 99% de homología de secuencia con cualquiera de una o más de las secuencias polipeptídicas de las secuencias peptidomiméticas del epítipo NPC-1 expuestas en las SEQ ID NOs: 1-24. Los métodos para determinar la homología entre secuencias de aminoácidos, así como las secuencias de ácido nucleico, son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Nedelkov & Nelson (2006) *New and Emerging Proteomic Techniques* Humana Press.

Por lo tanto, un peptidomimético del epítipo NPC-1 puede tener al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología de secuencia con una secuencia polipeptídica de las SEQ ID NOs: 1-24. Por ejemplo, un peptidomimético del epítipo NPC-1 puede tener al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92 %, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de homología de secuencia con las SEQ ID NOs: 1-24. La variante peptidomimética del epítipo NPC-1 descrita en este documento puede conservar la antigenicidad de la secuencia de la que se derivaron (por ejemplo, una variante peptidomimética del epítipo NPC-1 con al menos aproximadamente 80% de homología con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 puede tener la misma antigenicidad que un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5).

El término homología, o identidad, se entiende que significa el número de aminoácidos que concuerdan (identidad) con otras proteínas, expresado en porcentaje. La identidad se determina preferiblemente comparando una secuencia dada con otras proteínas con la ayuda de programas de ordenador. Si las secuencias que se comparan entre sí tienen una longitud diferente, la identidad debe determinarse de tal manera que el número de aminoácidos que la secuencia corta comparte con la secuencia más larga determina el porcentaje de identidad. La identidad se puede determinar rutinariamente por medio de programas informáticos conocidos que están disponibles públicamente tales como, por ejemplo, ClustalW. Thompson, et al., (1994) *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680. ClustalW está disponible públicamente en el Laboratorio Europeo de Biología Molecular y puede descargarse de varias páginas de Internet, entre otras, el IGBMC (Instituto de Genetique et Biologie Moleculaire et Cellulaire) y el EBI y todas las páginas de Internet del EBI (Instituto Europeo de Bioinformática). Si se usa el programa informático ClustalW versión 1.8 para determinar la identidad entre, por ejemplo, la proteína de referencia de la presente solicitud y otras proteínas, se deben establecer los siguientes parámetros: KTUPLE = 1, TOPDIAG = 5, WINDOWS = 5, PAIRGAP = 3, GAOPEN = 10, GAPEXTEND = 0,05, GAPDIST = 8, MAXDIV = 40, MATRIX = GONNET, ENDGAPS (OFF), NOPGAP, NOHGAP. Véase también la caja de herramientas del Instituto Europeo de Bioinformática (EBI) disponible en línea y Smith (2002) *Protein Sequencing Protocols* [2a Ed.] Humana Press.

Una posibilidad de encontrar secuencias similares es realizar investigaciones de bases de datos de secuencias. En el presente documento, una o más secuencias pueden ingresarse de la manera conocida para consulta. Esta secuencia de consulta se compara luego con las secuencias presentes en las bases de datos seleccionadas mediante programas estadísticos de ordenador. Estas consultas de base de datos (búsquedas en BLAST) son conocidas por el trabajador calificado y pueden obtenerse con diferentes proveedores. Por ejemplo, si tales consultas en bases de datos de este tipo se llevan a cabo en el NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica), se deben usar las configuraciones estándar para la consulta de comparación respectiva. Para las comparaciones de secuencias de proteínas (BLASTP), estas configuraciones son: Límite de entrada = no activado; Filtro = baja complejidad activada; Valor esperado = 10; tamaño de palabra = 3; Matriz = BLOSUM62; Costos de por hueco: Existencia = 11, Extensión = 1. El resultado de tal consulta es, entre otros parámetros, el grado de identidad entre la secuencia de consulta y las secuencias similares encontradas en las bases de datos.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 incluyen fragmentos funcionales de dichos peptidomiméticos. Un "fragmento funcional" de dicho polipéptido incluye un fragmento del gen o ADNc que codifica dicho epítipo NPC-1, cuyo fragmento es capaz de provocar una respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral o celular). Por lo tanto, por ejemplo, fragmentos del epítipo NPC-1 de acuerdo con la invención que corresponde a residuos de aminoácidos que contribuyen a la inmunogenicidad del antígeno y cuyos fragmentos pueden servir para funcionar como antígenos para provocar una respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral o celular). Esto incluye isoformas empalmadas diferencialmente y los comienzos transcripcionales de los polipéptidos de acuerdo con la invención. Los polipéptidos de acuerdo con la invención también pueden comprender fragmentos, derivados y variantes alélicas de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Los métodos y materiales para elaborar fragmentos de peptidomiméticos del epítipo NPC-1 son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis, et al., (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

La variante de peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden conservar su especificidad antigénica para unirse a sus respectivos anticuerpos (por ejemplo, una variante de los peptidomimético del epítipo NPC-1 se une al anticuerpo NEO-101). Las variantes completamente antigénicas pueden contener solo variaciones conservadoras o variaciones en residuos no críticos o en regiones no críticas. Las variantes antigénicas también pueden contener la sustitución de aminoácidos similares que no producen ningún cambio o un cambio insignificante en la antigenicidad. Alternativamente, tales sustituciones pueden afectar positiva o negativamente la antigenicidad en cierto grado. Las variantes no antigénicas típicamente contienen una o más sustituciones, supresiones, inserciones, inversiones o truncamientos de aminoácidos no conservadoras o una sustitución, inserción, inversión o supresión en un residuo crítico o región crítica de un epítipo. Las técnicas de biología molecular y bioquímicas para modificar los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 conservando la antigenicidad específica de los polipéptidos para sus respectivos anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Ho. et al. (1989) *Gene* 77(1): 51-59; Landt, et al., (1990) *Gene* 96 (1): 125-128; Hopp & Woods (1991) *Proc. Natl Acad Sci. EE. UU.* 78 (6): 3824-3828; Kolaskar y Tongaonkar (1990) *FEBS Letters* 276 (1-2): 172-174; y Welling, et al., (1985) *FEBS Letters* 188 (2): 215-218.

Los aminoácidos que son esenciales para la función pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de barrido con alanina. Cunningham, et al., (1989) *Sci.* 244: 1081-85. El último procedimiento introduce mutaciones de alanina individuales en cada residuo en la molécula. Las moléculas mutantes resultantes se analizan para determinar la actividad biológica, como la unión a epítopos o la actividad de ADCC *in vitro*. Los sitios que son críticos para la unión de ligando-receptor también pueden determinarse mediante análisis estructural tal como cristalografía, resonancia magnética nuclear o etiquetado de fotoafinidad. Smith, et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 224: 899-904; de Vos, et al., (1992) *Sci* 255: 306-12.

Por ejemplo, una clase de sustituciones son las sustituciones conservadas de aminoácidos. Tales sustituciones son aquellas que sustituyen un aminoácido dado en un peptidomimético del epítipo NPC-1 con otro aminoácido de características similares. Típicamente, las sustituciones conservadoras son sustituciones, una por otra, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Ile; intercambio de los residuos hidroxilo Ser y Thr, intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los residuos amida Asn y Gln, intercambio de los residuos básicos Lys y Arg, sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. La guía sobre qué cambios de aminoácidos pueden ser fenotípicamente silenciosos se encuentra, por ejemplo, en Bowie, et al., (1990) *Sci.* 247: 1306-10. Por lo tanto, un experto en la técnica aprecia que los inventores poseen variantes peptídicas sin delimitar todas las variantes específicas. En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o proteína que altera, agrega o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada en forma conservadora" en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Dichas variantes modificadas de manera conservadora son además y no excluyen variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención. Véase, por ejemplo, Creighton (1992) *Proteins: Structures and Molecular Properties* [2a Ed.] W.H. Freeman.

Además, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden contener aminoácidos distintos de los veinte aminoácidos "naturales". Además, muchos aminoácidos, incluidos los aminoácidos terminales, pueden modificarse mediante procesos naturales, como el procesamiento y otras modificaciones postraduccionales, o mediante técnicas de modificación química bien conocidas en la técnica. Las modificaciones conocidas incluyen, pero no se limitan a, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de una fracción hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado de lípido unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclización, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, γ -carboxilación, glicosilación, formación de ancla de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación. Véase Creighton (1992) *Proteins: Structure and Molecular Properties* [2a Ed.] y Lundblad (1995) *Techniques in Protein Modification* [1a Ed.]. Muchas revisiones detalladas están disponibles sobre esta materia. Véase, por ejemplo, Wold (1983) *Posttranslational Covalent Modification of Proteins* Acad. Press, NY; Seifter, et al., (1990) *Meth. Enzymol.* 182: 626-46; y Rattan, et al., (1992) *Ann. NY Acad. Sci.* 663: 48-62.

Proteínas de fusión

Las fusiones que comprenden los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 también están dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, las proteínas de fusión pueden comprender una secuencia peptidomimética del epítipo NPC-1 fusionada al extremo terminal C de las secuencias de GST. Dichas proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 recombinante. Alternativamente, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden fusionarse con una proteína que se une a los folículos de las células B, iniciando así una respuesta inmune humoral y la activación de las células T. Berney, et al. (1999) *J. Exp. Medicina.* 190: 851-60. Alternativamente, por ejemplo, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden acoplar genéticamente con un anticuerpo de células anti-dendríticas para administrar el antígeno al sistema inmunitario y estimular una respuesta inmunitaria celular. He, et al., (2004) *Clin. Cancer Res.* 10: 1920-27. Una proteína quimérica o de fusión de la invención puede producirse mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Por ejemplo, los fragmentos de ADN que codifican las diferentes secuencias de polipéptidos se ligan juntos en el marco de acuerdo con las técnicas convencionales, por ejemplo, empleando terminales de extremo romo o extremo escalonado para la ligación, digestión con enzimas de restricción para proporcionar los extremos apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar uniones indeseables y ligadura enzimática. El gen de fusión puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores automáticos de ADN.

Las proteínas de fusión pueden incluir secuencias de translocación del extremo terminal C o el extremo terminal N. Además, las proteínas de fusión que comprenden peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden comprender elementos adicionales, por ejemplo, para la detección, purificación u otras aplicaciones de proteínas. La detección y la purificación facilitan dominios que incluyen, entre otros, péptidos quelantes de metales, tales como tramos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano u otros dominios que permiten la purificación sobre metales inmovilizados; proteína de unión a la maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación sobre inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAG (Immunex Corp, Seattle WA).

Una proteína de fusión que comprende un peptidomimético del epítipo NPC-1 puede prepararse a partir de una proteína de la invención mediante fusión con una porción de una inmunoglobulina que comprende una región constante de una inmunoglobulina. Más preferiblemente, la porción de la inmunoglobulina comprende una región constante de cadena pesada que es opcionalmente y más preferiblemente una región constante de cadena pesada humana. La región constante de cadena pesada es más preferiblemente una región constante de cadena pesada de IgG, y opcionalmente y más preferiblemente es una cadena Fc, lo más preferiblemente un fragmento Fc de IgG que comprende dominios CH2 y CH3. Aunque se puede usar opcionalmente cualquier subtipo de IgG, se prefiere el subtipo IgG1. La cadena Fc puede ser opcionalmente una cadena Fc conocida o "de tipo silvestre", o alternativamente puede

estar mutada. Véase, por ejemplo, la publicación de la solicitud de patente estadounidense número 2006/0034852. El término "cadena de Fc" también comprende opcionalmente cualquier tipo de fragmento Fc. Se han identificado varios de los residuos de aminoácidos específicos que están involucrados en la actividad mediada por la región constante del anticuerpo en la subclase de IgG. La inclusión, sustitución o exclusión de estos aminoácidos específicos permite, por lo tanto, la inclusión o exclusión de la actividad mediada por la región constante de inmunoglobulina específica. Además, los cambios específicos pueden resultar en una aglicosilación, por ejemplo, y/u otros cambios deseados en la cadena de Fc. Al menos algunos cambios pueden hacerse opcionalmente para bloquear una función de Fc que se considera indeseable, tal como un efecto indeseable del sistema inmune. Véase McCafferty, et al., (2002) *Antibody Engineering: A Practical Approach* (Eds.) Oxford University Press.

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

Conjugados

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden conjugarse con otras fracciones. Tales conjugados se usan a menudo en la preparación de vacunas. El peptidomimético del epítipo NPC-1 puede conjugarse con un portador de carbohidratos (por ejemplo, manosa, fucosa, glucosa, GlcNA, maltosa), que es reconocido por el receptor de manosa presente en las células dendríticas y macrófagos. Las funciones de unión, agregación y endocitosis y fagocitosis mediadas por receptores proporcionan una inmunidad innata y adaptativa mejoradas. Véase, Mahnke, et al., (2000) *J. Cell Biol.* 151: 673-84; Dong, et al., (1999) *J. Immunol.* 163: 5427-34. Otras fracciones adecuadas para conjugación incluyen portadores que provocan una respuesta inmune que incluye, entre otras, hemocianina de lapa californiana (KLH), ovoalbúmina, albúmina de suero bovino (BSA), toxoide de la difteria, toxoide del cólera, exoproteína A de *Pseudomonas* y proteínas de membrana externa microbiana (OMP). Además, los conjugados peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden usarse para generar anticuerpos que incluyen, entre otros, anticuerpos monoclonales que se unen al peptidomimético del epítipo NPC-1 y, por lo tanto, se unen selectivamente a MUC5AC en células tumorales pero no en células normales.

Aislamiento del polipéptido

La presente invención también proporciona métodos para el aislamiento del peptidomimético del epítipo NPC-1. Por ejemplo, se pueden obtener líneas celulares relevantes o muestras de tumores de un paciente con cáncer. Después de la homogeneización y solubilización en un detergente, el antígeno se purifica cromatográficamente. La cromatografía de exclusión por tamaño o afinidad se puede usar para esto, y se puede usar junto con la unión del anticuerpo NEO-101. Véase la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401 para una descripción de los anticuerpos NEO-100 incluyendo el anticuerpo NEO-101. Por ejemplo, el anticuerpo NEO-101 puede inmovilizarse sobre un soporte sólido (por ejemplo, acoplado a resinas, perlas magnéticas) para la adsorción, el lavado y la elución del antígeno simple del soporte sólido. La proteína eluida se estudia más a fondo para determinar la presencia, caracterización e identificación del antígeno. La proteína eluida es luego estudiada adicionalmente por la presencia, caracterización e identificación del antígeno. Véase Walker (2002) *Protein Protocols Handbook* [2a Ed.] Humana Press y Cultur (2003) [Ed.] *Protein Purification Protocols* Humana Press.

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

Adicionalmente, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden servir como un antígeno en la identificación de actividades como parte de un cribado de alto rendimiento. Los expertos en la técnica conocen métodos de cribado de alto rendimiento. Wells (2002) *High Throughput Bioanalytical Sample Preparation* Elsevier Health Sciences.

Anticuerpos que se unen al peptidomimético del epítipo NPC-1

También se describen anticuerpos que se unen al peptidomimético del epítipo NPC-1, que incluyen pero no se limitan a anticuerpos monoclonales y humanizados (por ejemplo, anticuerpo NEO-101 como se describe en la Solicitud Internacional de Patente N° WO 2011/163401). Dichos anticuerpos también se unen selectivamente a MUC5AC aberrante en células tumorales pero no en células normales (por ejemplo, células sanas). Los anticuerpos de unión a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden mezclar en composiciones con portadores y anticuerpos farmacéuticos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales NEO-201 y/o NEO-301). Los ejemplos de anticuerpos de unión

a NPC-1 (por ejemplo, anticuerpos NEO-100) se proporcionan en la Tabla 4.

TABLA 4: Anticuerpos de la serie NEO-100 que se unen selectivamente a un epítipo NPC-1.

Anticuerpo	Alinasas	Antígeno	Ejemplos de las SEQ ID NO	Descripción
NPC-1		NPC-1		Hibridoma murino que expresa IgG1 NPC-1 (ATCC)
NEO-101	NPC-1C, ensituximab	NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOs: 57, 58) CDR de LC (SEQ ID NOs: 59-61) Cadena pesada (SEQ ID NOs: 62, 63) CDR de HC (SEQ ID NOs: 64-66)	Anticuerpo NEO-101 quimérico, modificado en el clon 4B7 de células para la producción de CHO-DG44; dirigido a una variante de MUC5AC
NEO-102		NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOs: 67, 68) CDR de LC (SEQ ID NOs: 69-71) Cadena pesada (SEQ ID NOs: 72, 73) CDR de HC (SEQ ID NOs: 74-76)	Anticuerpo NEO-101 quimérico, modificado en células para la producción CHO-M, contiene 2 cambios de aminoácidos en el dominio constante de HC*
NEO-103		NPC-1	Cadena ligera (SEQ ID NOs: 77, 78) Cadena pesada (SEQ ID NOs: 79, 80)	Anticuerpo NEO-101 humanizado

5 Los anticuerpos pueden comprender dos cadenas polipeptídicas ligeras idénticas con un peso molecular de aproximadamente 23.000 daltons ("cadena ligera"), y dos cadenas pesadas idénticas con un peso molecular de 53.000-70.000 ("cadena pesada"). Véase Edelman (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190: 5. Las cuatro cadenas están unidas por enlaces disulfuro en una configuración en "Y" en la que las cadenas ligeras sujetan las cadenas pesadas a partir de la boca de la configuración en "Y". La porción "ramificada" de la configuración en "Y" se denomina como la región F_{ab}; la porción del vástago de la configuración en "Y" se designa como la región F_c. La orientación de la secuencia de aminoácidos va en dirección desde el extremo terminal N en la parte superior de la configuración en "Y" hasta el extremo terminal C en la parte inferior de cada cadena. El extremo terminal N posee la región variable que tiene especificidad por el antígeno que lo provocó, y tiene una longitud de aproximadamente 100 aminoácidos, habiendo ligeras variaciones entre la cadena ligera y pesada y de anticuerpo a anticuerpo.

15 La región variable está unida en cada cadena a una región constante que extiende la longitud restante de la cadena y que dentro de una clase particular de anticuerpo no varía con la especificidad del anticuerpo (es decir, el antígeno que lo provoca). Existen cinco clases principales conocidas de regiones constantes que determinan la clase de la molécula de inmunoglobulina (por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE que corresponden a las regiones constantes de cadena pesada γ , μ , α , δ y ϵ). La región o clase constante determina la función efectora posterior del anticuerpo, incluida la activación del complemento (Kabat (1976) Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry [2a Ed.] Páginas 413-436; Holt, Rinehart, Winston) y otras respuestas celulares (Andrews, et al. (1980) Clinical Immunobiology 1-38; Kohl, et al. (1983) Immunology 48: 187) mientras que la región variable determina el antígeno con el que reaccionará. Las cadenas ligeras se clasifican como κ (kappa) o λ (lambda). Cada clase de cadena pesada puede prepararse con una cadena ligera kappa o lambda. Las cadenas ligera y pesada están unidas covalentemente entre sí, y las porciones de "cola" de las dos cadenas pesadas están unidas entre sí por enlaces disulfuro covalentes cuando las inmunoglobulinas son generadas por hibridomas o por células B.

30 La unión específica a un anticuerpo en tales condiciones puede requerir un anticuerpo que se seleccione por su especificidad para una proteína particular. Por ejemplo, los anticuerpos policlonales generados contra proteínas básicas seminales de especies específicas como rata, ratón o humano pueden seleccionarse para obtener solo aquellos anticuerpos policlonales que son específicamente inmunoreactivos con proteína básica seminal y no con otras proteínas, excepto las variantes polimórficas y los alelos de proteína básica seminal. Esta selección se puede lograr restando los anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con moléculas de proteína básica seminal de otras especies. Se puede usar una variedad de formatos de inmunoensayo para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína particular. Por ejemplo, los inmunoensayos ELISA en fase sólida se usan de forma rutinaria para seleccionar anticuerpos específicamente inmunorreactivos con una proteína. Véase, por ejemplo, Harlow & Lane (1998) USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL Cold Spring Harbor Laboratory, para una descripción de los formatos y condiciones del inmunoensayo que se pueden usar para determinar la inmunorreactividad específica.

Normalmente, una reacción específica o selectiva será al menos el doble de la señal o ruido de fondo y, más típicamente, más de aproximadamente 10 a 100 veces el fondo.

Anticuerpo policlonal

5 Los anticuerpos policlonales son poblaciones heterogéneas de moléculas de anticuerpo derivadas de los sueros de animales inmunizados con un antígeno. Los anticuerpos policlonales que se unen selectivamente al peptidomimético del epítipo NPC-1 pueden prepararse por métodos bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Howard y Kaser (2007) *Making and Using Antibodies: A Practical Handbook* CRC Press.

Anticuerpo monoclonal

10 Un anticuerpo monoclonal contiene una población sustancialmente homogénea de anticuerpos específicos para antígenos, cuya población contiene sitios de unión a epítipo sustancialmente similares. Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497; Patente de Estados Unidos N° 4.376.110; Ausubel, et al. [Eds.] (2011) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY.; y Harlow & Lane (1998) *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory; Colligan, et al., (2005) [Eds.] *Current Protocols in Immunology* Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, NY. Tales anticuerpos pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina que incluye IgG, IgM, IgE, IgA, GILD y cualquier subclase de las mismas. Un hibridoma que produce un anticuerpo puede cultivarse *in vitro*, *in situ* o *in vivo*. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales que se unen a un peptidomimético del epítipo NPC-1 incluyen, pero no se limitan a, un anticuerpo NEO-101 que se une selectivamente al epítipo NPC-1 (por ejemplo, los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 57, 58 con CDR representadas en las SEQ ID NOs: 59-61 y las cadenas pesadas se representan en las SEQ ID NOs: 62, 63 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 64-66, los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 67, 68 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 69-71 y las cadenas pesadas se representan en las SEQ ID NOs: 72, 73 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 74-76, y los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 77, 78 y las cadenas pesadas se representan en las SEQ ID NOs: 79, 80).

Anticuerpo quimérico

30 Los anticuerpos quiméricos son moléculas cuyas porciones diferentes se derivan de diferentes especies animales, como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana, que se utilizan principalmente para reducir la inmunogenicidad en la aplicación y para aumentar los rendimientos en producción, por ejemplo, donde los anticuerpos monoclonales murinos tienen mayores rendimientos de hibridomas pero mayor inmunogenicidad en humanos, de modo que se usan anticuerpos monoclonales quiméricos murinos humanos. Los anticuerpos quiméricos y los métodos para su producción son conocidos en la técnica. Véase Cabilly, et al., (1984) *Proc. Natl Acad Sci. EE. UU.* 81: 3273-3277; Morrison, et al., (1994) *Proc. Natl Acad Sci. EE. UU.* 81: 6851-6855; Boulianne, et al., (1984) *Nature* 312: 643-646; Neuberger, et al (1985) *Nature* 314: 268-270; Solicitud de Patente Europea 173494 (1986); WO 86/01533 (1986); Solicitud de Patente Europea 184187 (1986); Sahagan, et al., (1986) *J. Immunol.* 137: 1066-1074; Liu, et al., (1987) *Proc. Natl Acad Sci. EE. UU.* 84: 3439-3443; Sun, et al., (1987) *Proc. Natl Acad Sci. EE. UU.* 84: 214-218; Better, et al., (1988) *Science* 240: 1041-1043; y Harlow & Lane (1998) *USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL* Cold Spring Harbor Laboratory; Patente de Estados Unidos No. 5.624.659. Los ejemplos de anticuerpos quiméricos incluyen pero no se limitan a NEO-101 (NEO-101) que se une selectivamente al epítipo NPC-1 (por ejemplo, los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 52, 58 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 59 61 y la cadena pesada representada en las SEQ ID NOs: 62, 63 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 64-66); NEO-102 que se une selectivamente al epítipo NPC-1 (por ejemplo, los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 67, 68 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 69-71 y la cadena pesada representada en las SEQ ID NOs: 72, 73 con las CDR representadas en las SEQ ID NOs: 74-76).

Anticuerpo humanizado

50 Los anticuerpos humanizados se modifican para contener incluso más dominios de inmunoglobulina de tipo humano, e incorporan solo las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo derivado de animal. Esto se puede lograr examinando la secuencia de los bucles hipervariables de las regiones variables del anticuerpo monoclonal, y ajustándolos a la estructura de las cadenas de anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. No. 6.187.287. Asimismo, otros métodos para producir anticuerpos humanizados ahora son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, las Patentes de EE.UU. Nos. 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; 6.054.297; 6.180.370; 6.407.213; 6.548.640; 6.632.927; y 6.639.055; Jones, et al., (1986) *Nature* 321: 522-525; Reichmann, et al., (1988) *Nature* 332: 323-327; Verhoeven, et al., (1988) *Science* 239: 1534-36; y Zhiqiang An (2009) [Ed.] *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* John Wiley & Sons, Inc. Los ejemplos de anticuerpos humanizados incluyen, entre otros, NEO-103, que se une selectivamente al epítipo NPC-1 (por ejemplo, los ejemplos de cadenas ligeras se representan en las SEQ ID NOs: 77, 78 y las cadenas pesadas se representan en las SEQ ID NOs: 79, 80).

Fragmentos de anticuerpos

Además de inmunoglobulinas completas (o sus equivalentes recombinantes), se pueden sintetizar fragmentos de inmunoglobulina que comprenden el sitio de unión al epítipo (por ejemplo, Fab', F(ab')₂ u otros fragmentos). Se pueden diseñar "fragmentos" o inmunoglobulinas mínimas utilizando técnicas de inmunoglobulina recombinante. Por ejemplo, las inmunoglobulinas "Fv" se pueden producir sintetizando una región de cadena ligera variable fusionada y una región de cadena pesada variable. Las combinaciones de anticuerpos también son de interés, por ejemplo, diacuerpos, que comprenden dos especificidades de Fv distintas. Los fragmentos de unión a antígenos de las inmunoglobulinas incluyen, entre otros, SMIP (compuestos inmunofarmacéuticos de molécula pequeña), anticuerpos de camello, nanocuerpos e IgNAR.

Anticuerpo antiidiotípico

Un anticuerpo anti-idiotípico (anti-Id) es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos generalmente asociados con el sitio de unión a antígeno de un anticuerpo. Un anticuerpo Id se puede preparar inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, una cepa de ratón) que la fuente del anticuerpo con el anticuerpo contra el cual se está preparando un anti-Id. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante produciendo un anticuerpo contra estos determinantes idiotípicos (el anticuerpo anti-Id). Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 4.699.880. El anticuerpo anti-Id también se puede usar como un "inmunógeno" para inducir una respuesta inmune en otro animal, produciendo el llamado anticuerpo anti-anti-id. El anti-anti-Id puede ser epitópicamente idéntico al anticuerpo original que indujo el anti-id. Por lo tanto, mediante el uso de anticuerpos contra los determinantes idiotípicos de un anticuerpo es posible identificar otros clones que expresan anticuerpos de especificidad idéntica. Un ejemplo de anticuerpo antiidiotípico es 4B6, que se une selectivamente al anticuerpo NEO-101, ambos descritos en la Solicitud Internacional de Patente No. WO 2011/163401. Este anticuerpo anti-idiotípico específico para el anticuerpo NEO-1. En una realización, la cadena ligera de dicho anticuerpo puede estar codificada por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 81. En una realización, la cadena ligera de dicho anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 82. La cadena ligera de dicho anticuerpo puede comprender CDR que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 83 y 84 y la secuencia peptídica Trp-Ala-Ser. La cadena pesada de dicho anticuerpo puede codificarse por la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 85. La cadena pesada de dicho anticuerpo puede comprender la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 86. La cadena pesada de dicho anticuerpo puede comprender CDR que comprenden la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 87, 88 y 89.

Anticuerpos diseñados y modificados

Un anticuerpo de la invención puede prepararse adicionalmente usando un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de V_H y/o V_L derivadas de un material de partida de anticuerpo para diseñar un anticuerpo modificado, cuyo anticuerpo modificado puede tener propiedades alteradas del anticuerpo de partida. Un anticuerpo puede ser diseñado modificando uno o más residuos dentro de una o ambas regiones variables (es decir, V_H y/o V_L), por ejemplo dentro de una o más regiones CDR y/o dentro de una o más regiones marco. Adicional o alternativamente, un anticuerpo puede diseñarse modificando residuos dentro de la región o regiones constantes, por ejemplo, para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo.

Un tipo de diseño de la región variable que se puede realizar es el injerto de CDR. Los anticuerpos interactúan con los antígenos objetivo predominantemente a través de los residuos de aminoácidos que se encuentran en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y ligera. Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR del anticuerpo específico natural injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades. Véase, por ejemplo, Riechmann, et al. (1988) Nature 332: 323-327; Jones, et al. (1986) Nature 321: 522-525; Reina, et al. (1989) Proc. Natl Acad. EE.UU. 86: 10029-10033; las patentes de Estados Unidos Nos. 5.225.539; 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370.

Las secuencias marco adecuadas pueden obtenerse a partir de bases de datos públicas de ADN o referencias publicadas que incluyen secuencias de genes de anticuerpos de línea germinal. Por ejemplo, las secuencias de ADN de la línea germinal para los genes de la región variable de la cadena ligera y pesada humana se pueden encontrar en la base de datos de secuencia de línea germinal humana "VBase" (disponible en Internet), así como en Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación del NIH No. 91-3242; Tomlinson, et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227: 776-798; y Cox, et al. (1994) Eur. J. Immunol. 24: 827-836.

Otro tipo de modificación de la región variable es mutar los residuos de aminoácidos dentro de las regiones V_H y/o V_L CDR1, CDR2 y/o CDR3 para mejorar así una o más propiedades de unión (por ejemplo, afinidad) del anticuerpo de interés. La mutagénesis dirigida al sitio o la mutagénesis mediada por PCR pueden realizarse para introducir la mutación o mutaciones y el efecto sobre la unión del anticuerpo, u otra propiedad funcional de interés, puede evaluarse en ensayos apropiados *in vitro* o *in vivo*. Preferiblemente se pueden introducir modificaciones conservadoras (como

se discute en el presente documento). Las mutaciones pueden ser sustituciones, adiciones o supresiones de aminoácidos, pero son preferiblemente sustituciones. Además, típicamente no se alteran más de uno, dos, tres, cuatro o cinco residuos dentro de una región CDR.

5 Los anticuerpos diseñados de la invención incluyen aquellos en los que se han realizado modificaciones en los residuos estructurales dentro de VH y/o VL, por ejemplo, para mejorar las propiedades del anticuerpo. Típicamente, tales modificaciones al marco se hacen para disminuir la inmunogenicidad del anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque es "mutar nuevamente" uno o más residuos del marco a la secuencia de la línea germinal correspondiente. Más específicamente, un anticuerpo que ha sufrido una mutación somática puede contener residuos estructurales que difieren de la secuencia de la línea germinal de la que se deriva el anticuerpo. Dichos residuos pueden identificarse comparando las secuencias marco del anticuerpo con las secuencias de la línea germinal de las que se deriva el anticuerpo.

10 Además o como alternativa a las modificaciones realizadas dentro del marco o las regiones CDR, los anticuerpos pueden diseñarse para incluir modificaciones dentro de la región Fc, típicamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo, como la semivida en suero, fijación del complemento, unión al receptor de Fc y/o citotoxicidad celular dependiente de antígeno. Además, un anticuerpo de la invención puede modificarse químicamente (por ejemplo, uno o más restos químicos pueden unirse al anticuerpo) o modificarse para alterar su glicosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo. Tales realizaciones se describen más adelante. La numeración de los residuos en la región Fc es la del índice de Kabat de la UE.

15 La región bisagra de CH1 puede modificarse de manera que se altera el número de residuos de cisteína en la región bisagra, por ejemplo, aumenta o disminuye. Véase la patente de Estados Unidos No. 5.677.425. El número de residuos de cisteína en la región bisagra de CH1 se puede alterar, por ejemplo, para facilitar el ensamblaje de las cadenas ligeras y pesadas o para aumentar o disminuir la estabilidad del anticuerpo.

20 La región bisagra Fc de un anticuerpo puede mutarse para disminuir la semivida biológica del anticuerpo. Más específicamente, se pueden introducir una o más mutaciones de aminoácidos en la región de la interfaz del dominio CH2-CH3 del fragmento de bisagra Fc, de modo que el anticuerpo tenga una unión deficiente de la proteína A de estafilococo (SpA) en relación con la unión de SpA del dominio de bisagra de Fc nativa. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos No. 6.165.745.

25 El anticuerpo puede modificarse para aumentar su semivida biológica. Varios enfoques son posibles. Por ejemplo, se pueden introducir una o más de las siguientes mutaciones: T252L, T254S, T256F. Véase la patente de Estados Unidos No. 6.277.375. Alternativamente, para aumentar la semivida biológica, el anticuerpo puede alterarse dentro de la región CH1 o CL para contener un epítipo de unión al receptor de rescate tomado de dos bucles de un dominio CH2 de una región Fc de una IgG. Véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 5.869.046 y 6.121.022.

30 La región Fc puede alterarse reemplazando al menos un residuo de aminoácido con un residuo de aminoácido diferente para alterar la función o funciones efectoras del anticuerpo. Por ejemplo, uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos de aminoácidos 234, 235, 236, 237, 297, 318, 320 y 322 pueden reemplazarse con un residuo de aminoácido diferente de modo que el anticuerpo tenga una afinidad alterada por un ligando efector, pero retiene la capacidad de unión al antígeno del anticuerpo parental. El ligando efector al que se puede alterar la afinidad puede ser, por ejemplo, un receptor Fc o el componente C1 del complemento. Véanse las patentes de Estados Unidos Nos. 5.624.821 y 5.648.260.

35 La región Fc puede modificarse para aumentar la capacidad del anticuerpo para mediar en la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) y/o aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc γ modificando uno o más aminoácidos en las siguientes posiciones: 238, 239, 248, 249, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 315, 320, 322, 324, 326, 327, 329, 331, 333, 334, 335, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 378, 382, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 o 439. Véase el documento WO 00/42072. Además, los sitios de unión en IgG1 humana para Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII y FcRn han sido mapeados y variantes con unión mejorada. Véase Shields, et al. (2001) J. Biol. Chem. 276: 6591-6604. Las mutaciones específicas en las posiciones 256, 290, 298, 333, 334 y 339 mejoran la unión a Fc γ RIII. Además, se muestra que los siguientes mutantes de combinación mejoran la unión a Fc γ RIII: T256A/S298A, S298A/E333A, S298A/K224A y S298A/E333A/K334A.

40 La glicosilación de un anticuerpo puede modificarse. Por ejemplo, se puede producir un anticuerpo aglicosilado (es decir, el anticuerpo carece de glicosilación). La glicosilación puede alterarse, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Tales modificaciones de carbohidratos pueden lograrse, por ejemplo, alterando uno o más sitios de glicosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glicosilación del marco de región variable para eliminar así la glicosilación en ese sitio. Dicha aglicosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.714.350 y 6.350.861.

45 Adicional o alternativamente, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glicosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tiene más

estructuras de GlcNac bisectantes. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados aumentan la capacidad ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con maquinaria de glicosilación alterada. Las células con maquinaria de glicosilación alterada se han descrito en la técnica y pueden usarse como células huésped en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glicosilación alterada. Véase la publicación de la solicitud de patente de Estados Unidos No. 2004/0110704 y Yamane-Ohnuki, et al. (2004) *Biotechnol Bioeng.* 87: 614-22; EP 1 176195 (2002); WO 2003/035835; Shields, et al. (2002) *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740; WO 99/54342; Umana, et al. (1999) *Nat- Biotech.* 17: 176-180; y Tarentino, et al. (1975) *Biochem.* 14: 5516-23.

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

También se describen variantes y equivalentes que son sustancialmente homólogos a los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, diacuerpos, SMIP, anticuerpos de camello, nanocuerpos, IgNAR, polipéptidos, regiones variables y CDR expuestos en el presente documento. Estos pueden contener, por ejemplo, mutaciones de sustitución conservadora, (es decir, la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos similares). Por ejemplo, la sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un aminoácido por otro dentro de la misma clase general, por ejemplo, un aminoácido ácido por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico por otro aminoácido básico o un aminoácido neutro por otro aminoácido neutro.

Métodos de modificación de anticuerpos

Los anticuerpos que tienen secuencias de VH y VL descritas en el presente documento pueden usarse para crear nuevas variantes de anticuerpos modificando las secuencias de VH y/o VL, o la región o regiones constantes unidas a los mismos. Por lo tanto, las características estructurales de una variante de anticuerpo de la invención, se utilizan para crear variantes de anticuerpos estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión al peptidomimético del epítipo NPC-1. El material de partida para el método de modificación puede ser una o más de las secuencias VH y/o VK proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Para crear el anticuerpo modificado, no es necesario preparar realmente (es decir, expresar como una proteína) un anticuerpo que tenga una o más de las secuencias de VH y/o VK proporcionadas en este documento, o una o más regiones CDR de las mismas. Más bien, la información contenida en la secuencia o secuencias se usa como material de partida para crear una secuencia o secuencias de "segunda generación" derivadas de la secuencia o secuencias originales y luego se prepara la secuencia o secuencias de "segunda generación" y se expresan como una proteína. Se pueden usar técnicas estándar de biología molecular para preparar y expresar secuencias de anticuerpos alteradas.

Las mutaciones pueden introducirse de forma aleatoria o selectiva a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante de anticuerpo y los anticuerpos modificados resultantes pueden seleccionarse para determinar la actividad de unión y/u otras propiedades funcionales deseadas. Véanse los documentos WO 2002/092780 y WO 2003/074679.

Ácidos nucleicos que codifican el peptidomimético del epítipo NPC-1

Otro aspecto de la invención se refiere a moléculas de ácido nucleico que codifican el peptidomimético del epítipo NPC-1. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico puede aislarse mediante purificación de otros componentes celulares u otros contaminantes (por ejemplo, otros ácidos nucleicos celulares o proteínas) mediante técnicas estándar, incluido el tratamiento alcalino/SDS, bandas de CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otros bien conocidos en el arte. Véase Ausubel, et al. (2011) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc. Un ácido nucleico de la invención puede ser, por ejemplo, ADN o ARN y puede contener o no secuencias intrónicas. El ácido nucleico puede ser una molécula de ADNc.

Los ácidos nucleicos de la invención pueden obtenerse usando técnicas estándar de biología molecular. Para anticuerpos expresados por hibridomas (por ejemplo, Hibridomas preparados a partir de ratones transgénicos portadores de genes de inmunoglobulina humana como se describe más adelante), los ADNc que codifican las cadenas ligeras y pesadas del anticuerpo producido por el hibridoma pueden obtenerse mediante técnicas estándar de amplificación por PCR o clonación de ADNc. Para los anticuerpos obtenidos de una biblioteca de genes de inmunoglobulina (por ejemplo, utilizando técnicas de presentación en fagos), el ácido nucleico que codifica el anticuerpo puede recuperarse de la biblioteca.

Específicamente, las sustituciones de codones degenerados se pueden lograr generando, por ejemplo, secuencias en las que la tercera posición de uno o más codones seleccionados está sustituida con residuos de base mixta y/o desoxiinosina. Batzer, et al. (1991) *Nucleic Acid Res.* 19: 5081; Ohtsuka, et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260: 2605-08;

Rossolini, et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8: 91-98.

Métodos para producir peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de forma recombinante

La presente invención también proporciona métodos para producir de forma recombinante el peptidomimético del epítipo NPC-1. Los expertos en la técnica conocen bien los métodos para producir peptidomiméticos.

5 Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la invención también pueden producirse mediante construcción, utilizando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica, un vector de expresión que contiene un operón y una secuencia de ADN que codifica los peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Además, la invención se refiere a vectores, especialmente plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores comunes en ingeniería genética, que contienen las moléculas de ácido nucleico de la invención mencionadas anteriormente. Las moléculas de ácido
10 nucleico contenidas en los vectores pueden estar unidas a elementos reguladores que aseguran la transcripción en células procariotas y eucariotas.

Los vectores contienen elementos que facilitan la manipulación para la expresión de una proteína foránea dentro de la célula huésped objetivo. Convenientemente, la manipulación de secuencias y la producción de ADN para la transformación se realiza primero en un huésped bacteriano (por ejemplo, *E. coli*) y generalmente los vectores incluirán
15 secuencias para facilitar tales manipulaciones, incluido un origen de replicación bacteriano y un marcador de selección bacteriano apropiado. Los marcadores de selección codifican proteínas necesarias para la supervivencia o el crecimiento de células huésped transformadas cultivadas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a los antibióticos u otras toxinas, complementan las deficiencias auxotróficas o suministran nutrientes críticos que no están disponibles en los medios complejos. Los
20 ejemplos de vectores y métodos para la transformación de levadura se describen en la técnica. Véase, por ejemplo, Burke, et al. (2000) Methods in Yeast Genetics Cold Spring Harbor Laboratory Press.

La secuencia codificante del polipéptido de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 puede unirse operativamente a secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción que proporcionan la expresión del polipéptido en células de levadura. Estos componentes del vector pueden incluir, pero no están limitados a, uno o más de los siguientes: un
25 elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción. También se pueden incluir secuencias para la secreción del polipéptido (por ejemplo, una secuencia señal).

Los ácidos nucleicos están "operativamente enlazados" cuando se colocan en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una secuencia señal está operativamente enlazado al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o
30 potenciador está operativamente enlazado a una secuencia de codificación si afecta a la transcripción de la secuencia. En general, "operativamente enlazado" se refiere en términos generales a secuencias de ADN enlazadas en forma contigua y, en el caso de un líder secretor, contiguo y en el marco de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos.

35 Los promotores son secuencias no traducidas ubicadas secuencia arriba (5') al codón de inicio de un gen estructural (generalmente dentro de aproximadamente 100 a 1000 pb) que controlan la transcripción y traducción de secuencias de ácido nucleico particulares a las que están operativamente enlazadas. Tales promotores se clasifican en varias clases: promotores inducibles, constitutivos y reprimibles (por ejemplo, que aumentan los niveles de transcripción en respuesta a la ausencia de un represor). Los promotores inducibles pueden iniciar niveles aumentados de transcripción
40 de ADN bajo su control en respuesta a algún cambio en las condiciones de cultivo (por ejemplo, la presencia o ausencia de un nutriente o un cambio en la temperatura).

Los vectores de expresión se transfectan en una célula huésped mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia para producir una célula huésped transfectada, dicha célula huésped transfectada se
45 cultiva mediante técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia para producir dichos peptidomiméticos del epítipo NPC-1.

Las células huésped usadas para expresar los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden ser una célula bacteriana tal como *E. coli*, levadura (por ejemplo, *S. cerevisiae*) o una célula eucariota (por ejemplo, una línea celular de mamífero). Se puede usar una célula de mamífero de un tipo bien definido para este propósito, tal como una célula de mieloma, 3T3, HeLa, C6A2780, Vera, MDCK II, una línea de células de ovario de hámster chino (CHO), Sf9, Sf21,
50 COS, NSO o HEK293.

Los métodos generales mediante los cuales se pueden construir los vectores, los métodos de transfección requeridos para producir la célula huésped y los métodos de cultivo requeridos para producir los anticuerpos, y fragmentos de los mismos, de dichas células huésped, incluyen todas las técnicas convencionales. Aunque preferiblemente la línea celular utilizada para producir los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 es una línea celular de mamífero, se puede
55 usar cualquier otra línea celular adecuada, tal como una línea celular bacteriana tal como una cepa bacteriana derivada de *E. coli*, o una línea celular de levadura.

De manera similar, una vez producidos, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden purificarse de acuerdo con

procedimientos estándar en la técnica, tales como, por ejemplo, filtración de flujo cruzado, precipitación con sulfato de amonio y cromatografía en columna de afinidad.

Generación de anticuerpos monoclonales que se unen a un peptidomimético del epítipo NPC-1 utilizando animales

5 Los anticuerpos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden ser anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra un peptidomimético del epítipo NPC-1 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunitario humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones denominados aquí como HuMAb Mouse® y KM Mouse® respectivamente, y se denominan colectivamente aquí como "ratones Ig humanos". El HuMAb Mouse® (Medarex, Inc.) contiene el miniloci del gen de la inmunoglobulina humana que codifica secuencias de inmunoglobulina de cadena ligera κ y pesada humana (μ y γ) no reorganizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de las cadenas μ y κ endógenas. Véase, por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859. Por consiguiente, los ratones muestran una expresión reducida de IgM o κ de ratón, y en respuesta a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y ligera humanos introducidos experimentan cambio de clase y mutación somática para generar IgG κ monoclonal humano de alta afinidad. Lonberg (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg y Huszar (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93, y Harding y Lonberg (1995) Ann. NY. Acad. Sci. 764: 536-546. La preparación y el uso de HuMAb Mouse®, y las modificaciones genómicas llevadas a cabo por tales ratones, se describen con más detalle en Taylor, et al. (1992) Nucleic Acids Research 20: 6287-6295; Chen, et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon, et al. (1993) Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 90: 3720-3724; Choi, et al. (1993) Nature Genetics 4: 117-123; Chen, et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon, et al. (1994) J. Immunol. 152: 2912-2920; Taylor, et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; y Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851. Véase además, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; 5.770.429; y 5.545.807; WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585; WO 97/13852; WO 98/24884; WO 99/45962; y WO 01/14424.

25 Los anticuerpos humanos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la invención pueden generarse utilizando un ratón que porta secuencias de inmunoglobulina humana en transgenes y transcromosomas, tal como un ratón que transporta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena ligera humana. Dichos ratones, denominados en este documento como "KM mice®", se describen en detalle en el documento WO 02/43478.

30 Además, los sistemas de animales transgénicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y pueden usarse para generar anticuerpos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo denominado Xenomouse (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Nos. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584 y 6.162.963.

35 Además, los sistemas animales transcromosómicos alternativos que expresan genes de inmunoglobulina humana están disponibles en la técnica y se pueden usar para generar anticuerpos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Por ejemplo, se pueden usar ratones que portan tanto un transcromosoma humano de cadena pesada como un transcromosoma humano de cadena ligera, denominados "ratones TC". Véase Tomizuka, et al. (2000) Proc. Natl Acad Sci. EE. UU. 97: 722-727. Además, las vacas que portan transcromosomas humanos de cadena pesada y ligera se han descrito en la técnica (Kuroiwa, et al. (2002) Nature Biotechnology 20: 889-894) y se pueden usar para generar anticuerpos que se unen selectivamente a peptidomiméticos del epítipo NPC-1.

45 Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando métodos de presentación en fagos para seleccionar bibliotecas de genes de inmunoglobulina humana. Tales métodos de presentación de fagos para aislar anticuerpos humanos se establecen en la técnica. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.223.409; 5.403.484; 5.571.698; 5.427.908; 5.580.717; 5.969.108; 6.172.197; 5.885.793; 6.521.404; 6.544.731; 6.555.313; 6.582.915 y 6.593.081.

Los anticuerpos monoclonales humanos de la invención también pueden prepararse usando ratones SCID en los que se han reconstituido células inmunitarias humanas de manera que puede generarse una respuesta de anticuerpo humano tras la inmunización. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 5.476.996 y 5.698.767.

50 Cuando se usan ratones Ig humanos para producir anticuerpos humanos de la invención, tales ratones pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de peptidomimético del epítipo NPC-1, como se describe por Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859; Fishwild, et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851; WO 98/24884 y WO 01/14424. Preferiblemente, los ratones tendrán 6-16 semanas de edad después de la primera infusión. Por ejemplo, se puede usar una preparación purificada o recombinante (5-50 μ g) de epítipo NPC-1 para inmunizar los ratones Ig humanos por vía intraperitoneal.

55 La experiencia previa con varios antígenos por otros ha demostrado que los ratones transgénicos responden cuando inicialmente se inmunizan por vía intraperitoneal (IP) con antígeno en adyuvante completo de Freund, seguido de inmunizaciones IP cada dos semanas (hasta un total de 6) con antígeno en adyuvante incompleto de Freund. Sin

embargo, los adyuvantes distintos a los de Freund también se consideran efectivos. Además, se encuentra que las células enteras en ausencia de adyuvante son altamente inmunogénicas. La respuesta inmune puede controlarse durante el curso del protocolo de inmunización, obteniéndose muestras de plasma mediante sangrados retroorbitales. El plasma puede explorarse por ELISA (como se describe a continuación), y los ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina humana anti-NPC-1 pueden usarse para fusiones. Los ratones pueden recibir un refuerzo intravenoso con antígeno 3 días antes de ser sacrificados y la extirpación del bazo. Se espera que sea necesario realizar 2-3 fusiones para cada inmunización. Entre 6 y 24 ratones se inmunizan típicamente para cada antígeno. Por lo general, se utilizan tanto las cepas HCo7 como HCo12. Además, tanto el transgén HCo7 como el HCo12 pueden combinarse en un solo ratón con dos transgenes diferentes de cadena pesada humana (HCo7/HCo12). Alternativa o adicionalmente, se puede usar la cepa KM Mouse®.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos de la invención, se pueden aislar esplenocitos y/o células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados y fusionarse a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos antigénicos. Por ejemplo, las suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados pueden fusionarse a una sexta parte del número de células de mieloma de ratón no secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) con PEG al 50%. Las células pueden sembrarse en placas a aproximadamente 2×10^5 en una placa de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de dos semanas en medio selectivo que contiene suero de clon fetal al 20%, medio acondicionado "653" al 18%, origen al 5% (IGEN), L-glutamina 4 mM, piruvato de sodio 1 mM, HEPES 5 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 unidades/mL de penicilina, 50 mg/mL de estreptomycin, 50 mg/mL de gentamicina y IX HAT (Sigma; la HAT se agrega 24 horas después de la fusión). Después de aproximadamente dos semanas, las células pueden cultivarse en un medio en el que la HAT se reemplaza por HT. Los pozos individuales se pueden analizar mediante ELISA para detectar anticuerpos monoclonales IgM e IgG humanos. Una vez que se produce un crecimiento extenso del hibridoma, el medio puede observarse generalmente después de 10-14 días. Los hibridomas que secretan anticuerpos pueden ser sembrados nuevamente en placa, cribados nuevamente, y si aún son positivos para IgG humana, los anticuerpos monoclonales pueden ser subclonados al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables pueden entonces cultivarse *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en el medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

Para purificar los anticuerpos monoclonales humanos, los hibridomas seleccionados pueden cultivarse en matraces de agitación de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Los sobrenadantes se pueden filtrar y concentrar antes de la cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa (Pharmacia, Piscataway, NJ). La IgG eluida se puede controlar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 utilizando un coeficiente de extinción de 1,43. Los anticuerpos monoclonales se pueden dividir en partes alícuotas y almacenarse a -80°C.

Polinucleótidos que codifican peptidomiméticos del epítipo NPC-1

También se describen nucleótidos del antígeno MUC5AC que codifican peptidomiméticos del epítipo NPC-1. También se describen fragmentos, secuencias hibridables con, y secuencias homólogas a las secuencias de polinucleótidos que codifican un peptidomimético del epítipo NPC-1 que son al menos aproximadamente 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 98.5%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100%.

La invención también describe polinucleótidos que comprenden al menos una secuencia peptidomimética del epítipo NPC-1 que codifica polipéptidos similares con diferente uso de codones, secuencias alteradas caracterizadas por mutaciones, tales como supresión, inserción o sustitución de uno o más nucleótidos, ya sea de forma natural o humana inducida, ya sea al azar o en forma dirigida. También se describen secuencias homólogas de ácido nucleico (por ejemplo, que forman parte de una secuencia de polinucleótidos de la presente invención), que incluyen regiones de secuencia únicas para los polinucleótidos de la presente invención.

La presente invención también describe ácidos nucleicos que codifican homólogos de peptidomiméticos del epítipo NPC-1, tales homólogos pueden ser al menos aproximadamente 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.8%, 99.9%, o 100% homólogos idénticos a las secuencias de aminoácidos expuestas en el presente documento, como puede determinarse utilizando el software BlastP del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI) utilizando parámetros predeterminados. También se describen fragmentos de los polinucleótidos y polipéptidos descritos anteriormente que tienen mutaciones, tales como supresiones, inserciones o sustituciones de uno o más ácidos nucleicos, ya sea de origen natural o inducido por el hombre, ya sea al azar o de forma selectiva.

Las moléculas de ácido nucleico pueden codificar un peptidomimético del epítipo NPC-1 de dicha molécula de ácido nucleico. Un "fragmento funcional" de dicho ácido nucleico incluye un fragmento del gen o ADNc que codifica dicho peptidomimético del epítipo NPC-1, cuyo fragmento puede ser expresado para producir un epítipo NPC-1 capaz de provocar una respuesta inmunitaria (por ejemplo, anticuerpos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1). Por lo

tanto, por ejemplo, los fragmentos del peptidomimético del epítipo NPC-1 de acuerdo con la invención que corresponden a los residuos de aminoácidos que contribuyen a la inmunogenicidad del antígeno y qué fragmentos pueden servir para funcionar como antígenos para provocar una respuesta inmune (por ejemplo, respuesta inmune humoral o celular). Este aspecto de la invención también incluye isoformas empalmadas diferencialmente y los inicios transcripcionales de los ácidos nucleicos de acuerdo con la invención. Las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención también comprenden fragmentos, derivados y variantes alélicas de las moléculas de ácido nucleico descritas anteriormente que codifican un peptidomimético del epítipo NPC-1 de acuerdo con la invención. Los métodos y materiales para preparar ácidos nucleicos que codifican fragmentos de peptidomiméticos del epítipo NPC-1 son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Además, la identidad se refiere en términos generales a la equivalencia funcional y/o estructural que existe entre las moléculas de ácido nucleico en cuestión o las proteínas codificadas por ellas. Las moléculas de ácido nucleico, que son homólogas a las moléculas descritas anteriormente y constituyen derivados de estas moléculas, son generalmente variaciones de estas moléculas, que constituyen modificaciones, que realizan la misma función biológica. Al mismo tiempo, las variaciones pueden ocurrir naturalmente, por ejemplo, pueden ser secuencias de otras especies, o pueden ser mutantes, en donde estos mutantes pueden haber ocurrido de manera natural o haber sido introducidos por mutagénesis objetiva. Las variaciones también pueden ser secuencias fabricadas sintéticamente. Las variantes alélicas pueden ser variantes naturales y también variantes fabricadas sintéticamente o variantes producidas por técnicas de ADN recombinante. Las moléculas de ácido nucleico, que se desvían de las moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la invención debido a la degeneración del código genético, constituyen una forma especial de derivados.

También se describen en el presente documento cualquier secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 de la misma. Debido a que el código genético está degenerado, se puede usar más de un codón para codificar un aminoácido particular. Usando el código genético, se pueden identificar uno o más nucleótidos diferentes, cada uno de los cuales sería capaz de codificar el aminoácido. La probabilidad de que un nucleótido particular constituya, de hecho, la secuencia codificante del codón real puede estimarse considerando las relaciones de emparejamiento de bases anormales y la frecuencia con la que realmente se usa un codón particular (para codificar un aminoácido particular) en células eucariotas o procariotas que expresan un peptidomimético del epítipo NPC-1 del mismo. Tales "reglas de uso de codones" son divulgadas por Lathe, et al. (1985) *J. Molec. Biol.* 183: 1-12.

Peptidomiméticos del epítipo NPC-1 modificado

Los nucleótidos descritos en el presente documento pueden ser polinucleótidos modificados. Los nucleótidos no modificados son a menudo menos óptimos en algunas aplicaciones, por ejemplo, propensos a la degradación por las nucleasas celulares. Las modificaciones químicas a una o más de las subunidades del oligonucleótido pueden conferir propiedades mejoradas, por ejemplo, pueden hacer que los polinucleótidos sean más estables a las nucleasas. Las modificaciones típicas de oligonucleótidos son bien conocidas en la técnica y pueden incluir uno o más de: (i) alteración, por ejemplo, reemplazo de uno o ambos de los oxígenos de fosfato no enlazantes y/o de uno o más de los oxígenos de fosfato enlazantes en el enlace interno del azúcar del fosfodiéster; (ii) la alteración, por ejemplo, el reemplazo, de un constituyente del azúcar de ribosa, por ejemplo, de la modificación o reemplazo del hidroxilo 2' en el azúcar de ribosa; (iii) sustitución total de la fracción de fosfato; (iv) modificación o reemplazo de una base natural con una base no natural; (v) reemplazo o modificación de la cadena principal de ribosa-fosfato, por ejemplo, con ácido nucleico peptídico (PNA); (vi) modificación del extremo 3' o del extremo 5' del oligonucleótido; y (vii) modificación del azúcar, por ejemplo, anillos de seis miembros. Los polinucleótidos utilizados de acuerdo con esta invención pueden sintetizarse por cualquier medio bien conocido en la técnica, o adquirirse a través de una variedad de proveedores comerciales (LC Sciences, Houston, TX; Promega, Madison, WI; Invitrogen, Carlsbad, CA).

El aislamiento y la expresión del peptidomimético del epítipo NPC-1, o fragmentos y variantes del mismo, pueden efectuarse mediante procedimientos de clonación bien establecidos utilizando sondas o cebadores construidos con base en las secuencias de ácidos nucleicos peptidomiméticos del epítipo del NPC-1 descritas en la solicitud. Las secuencias peptidomiméticas relacionadas con el epítipo NPC-1 también pueden identificarse a partir de bases de datos genómicas humanas u otras especies usando las secuencias descritas en el presente documento y las tecnologías de búsqueda conocidas basadas en ordenador, por ejemplo, la búsqueda de secuencias BLAST. Los pseudogenes divulgados en este documento pueden usarse para identificar alelos funcionales o genes relacionados.

Los vectores de expresión pueden usarse luego para infectar o transfectar células huésped para la expresión funcional de estas secuencias. Estos genes y vectores pueden fabricarse y expresarse *in vitro* o *in vivo*. Un experto reconocerá que los fenotipos deseados para alterar y controlar la expresión de ácidos nucleicos pueden obtenerse modulando la expresión o actividad de los genes y ácidos nucleicos (por ejemplo, promotores, potenciadores) dentro de los vectores de la invención. Se puede usar cualquiera de los métodos conocidos descritos para aumentar o disminuir la expresión o actividad.

Las secuencias de polinucleótidos proporcionadas en el presente documento pueden generarse de acuerdo con cualquier método de síntesis de oligonucleótidos conocido en la técnica, tal como síntesis enzimática o síntesis en

- fase sólida. Los equipos y los reactivos para realizar la síntesis en fase sólida están disponibles comercialmente, por ejemplo, a través de Applied Biosystems. También se puede emplear cualquier otro medio para tal síntesis; la síntesis real de los polinucleótidos está dentro de las capacidades de un experto en la materia. Véase, por ejemplo, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; Swamy (2008) *Laboratory Manual on Biotechnology*, Publicaciones Rastogi; Herdewijn (2005) [Ed.] *Methods in Molecular Biology: Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications*, volumen 288 Humana Press; y Rapley (2000) [Ed.] *The Nucleic Acid Protocols Handbook* Humana Press. Los fragmentos de ADN de doble cadena se pueden obtener luego sintetizando la cadena complementaria e hibridando las cadenas en condiciones apropiadas, o agregando la cadena complementaria utilizando ADN polimerasa con una secuencia cebadora apropiada.
- 5
- 10 Las técnicas para la manipulación de ácidos nucleicos, tales como, por ejemplo, para generar mutaciones en secuencias, subclonación, sondas de marcaje, secuenciación, hibridación están bien descritas en la bibliografía científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) Ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Tijssen (1993) [Ed.] *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology: Hybridization With Nucleic Acid Probes, Parte I, Theory and Nucleic Acid Preparation*, Elsevier, NY.
- 15
- La hibridación y la fuerza de la hibridación (por ejemplo, la fuerza de asociación entre polinucleótidos) se ve afectada por muchos factores bien conocidos en la técnica, que incluyen el grado de complementariedad entre los polinucleótidos y la rigurosidad de las condiciones involucradas, que se ven afectadas por condiciones tales como la concentración de sales, la presencia de otros componentes (por ejemplo, la presencia o ausencia de polietilenglicol), la molaridad de las cadenas de hibridación y el contenido de G + C de las cadenas de polinucleótidos, todo lo cual resulta en una Temperatura de fusión (T_m) característica del híbrido formado. Las técnicas de hibridación de ácidos nucleicos están descritas por Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory, y por Haymes, et al. (1985) en *NUCLEIC ACID HYBRIDIZATION, A PRACTICAL APPROACH* (IRL Press, DC). Las condiciones de lavado de hibridación pueden incluir una solución de lavado de 0,2 x SSC/SDS al 0,1% e incubación con rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente (lavado de baja rigurosidad), solución de lavado de (42°C) 0,2 x SSC/SDS al 0,1% precalentada e incubación con rotación durante 15 minutos a 42°C (lavado de rigurosidad media) y solución de lavado de (68°C) 0,1 x SSC/SDS al 0,1% precalentada e incubación con rotación durante 15 minutos a 68°C (lavado de alta rigurosidad). Véase Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc.
- 20
- 25
- 30 Los cebadores oligonucleotídicos se pueden usar para amplificar ácidos nucleicos que codifican peptidomiméticos del epítipo NPC-1. Los ácidos nucleicos descritos en el presente documento también pueden clonarse o medirse cuantitativamente usando técnicas de amplificación. Los métodos de amplificación también son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Innis (1990) [Ed.] *PCR Protocols, a Guide to Methods and Applications*, Academic Press, NY.; Innis (1995) [Ed.] *PCR Strategies*, Academic Press, Inc., NY.); reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Wu (1989) *Genomics* 4: 560; Landegren (1988) *Science* 241: 1077; Barringer (1990) *Gene* 89: 117); amplificación de la transcripción (Kwoh (1989) *PNA* 5: 86: 1173); replicación autosostenida de la secuencia (Guatelli (1990) *PNAS* 87: 1874); amplificación de Q Beta replicasa (Smith (1997) *J. Clin. Microbiol.* 35: 1477-91)); ensayo automatizado de amplificación de la Q-beta replicasa (Burg (1996) *Mol. Cell. Probes* 10: 257-71); y otras técnicas mediadas por la ARN polimerasa (por ejemplo, NASBA, Cangene, Mississauga, Ontario). Véase, también, Berger (1987) *Methods Enzymol.* 152: 307-16; Sambrook, et al. (2001) (Eds.) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory; Ausubel, et al. (2011) [Ed.] *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., Nueva York; Maniatis, et al (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press; las patentes de Estados Unidos Nos. 4.683.195 y 4.683.202; Sooknanan (1995) *Biotechnology* 13: 563-64.
- 35
- 40
- 45 Los paradigmas para diseñar pares de cebadores degenerados son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un programa informático de la estrategia del cebador oligonucleótido híbrido degenerado de consenso (CODEHOP) es fácilmente accesible y está directamente relacionado desde el sitio de alineación de secuencias múltiples de BlockMaker para la predicción de cebadores híbridos que comienza con un conjunto de secuencias de proteínas relacionadas, como las secuencias peptidomiméticas del epítipo NPC-1 que se proporcionan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Rose (1998) *Nucleic Acids Res.* 26: 1628-35; Singh (1998) *Biotechniques* 24: 318-19.
- 50
- Las variantes polimórficas, los alelos y los homólogos interespecies que son sustancialmente idénticos a los epítopos NPC-1 descritos en el presente documento pueden aislarse utilizando las sondas de ácido nucleico descritas anteriormente. Alternativamente, las bibliotecas de expresión se pueden usar para clonar peptidomiméticos del epítipo NPC-1 y variantes polimórficas, alelos y homólogos interespecies de los mismos, al detectar homólogos expresados inmunológicamente con antisueros o anticuerpos purificados fabricados contra un peptidomimético del epítipo NPC-1, que también reconocen y se unen selectivamente al homólogo peptidomimético del epítipo NPC-1.
- 55
- Los ácidos nucleicos que codifican los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden generarse por amplificación (por ejemplo, PCR) de secuencias de ácido nucleico apropiadas utilizando pares de cebadores apropiados (perfectos o degenerados). El ácido nucleico amplificado puede ser ADN genómico de cualquier célula o tejido o ARNm o ADNc derivado de células que expresan NPC-1. Los métodos para la expresión de secuencias heterólogas en células
- 60

huésped son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Maniatis, et al. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [3a Ed.] Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Proteínas de fusión que comprenden peptidomiméticos del epítipo NPC-1

5 Se pueden construir secuencias híbridas codificantes de proteínas que comprenden ácidos nucleicos que codifican peptidomiméticos del epítipo NPC-1 fusionados con secuencias de translocación. También se proporcionan epítopos NPC-1 híbridos que comprenden los motivos y regiones antigénicas. Estas secuencias de ácido nucleico pueden unirse operativamente a elementos de control transcripcionales o de traducción, por ejemplo, secuencias de inicio de la transcripción y traducción, promotores y potenciadores, terminadores de la transcripción y traducción, secuencias de poliadenilación y otras secuencias útiles para transcribir ADN en ARN. En la construcción de casetes de expresión recombinante, vectores y transgénicos, se puede emplear un fragmento promotor para dirigir la expresión del ácido nucleico deseado en todas las células o tejidos deseados.

15 Las proteínas de fusión pueden comprender secuencias de translocación del extremo terminal C o del extremo terminal N. Además, las proteínas de fusión pueden comprender elementos adicionales, por ejemplo, para la detección, purificación u otras aplicaciones de proteínas. Los dominios que facilitan la detección y la purificación incluyen, por ejemplo, péptidos quelantes metálicos, tales como tramos de polihistidina, módulos de histidina-triptófano u otros dominios que permiten la purificación en metales inmovilizados; proteína de unión a la maltosa; dominios de proteína A que permiten la purificación en inmunoglobulina inmovilizada; o el dominio utilizado en el sistema de purificación de extensión/afinidad FLAGS (Immunex Corp., Seattle, WA).

20 La inclusión de secuencias enlazadoras escindibles tales como el Factor Xa (véase, por ejemplo, Ottavi, (1998) *Biochimie* 80: 289-93), motivo de reconocimiento de la proteasa subtilisina (véase, por ejemplo, Polyak (1997) *Protein Eng.* 10: 615-1); la enteroquinasa (Invitrogen, San Diego, CA.), entre el dominio de translocación (para una expresión eficaz de la membrana plasmática) y el resto del polipéptido recién traducido puede ser útil para facilitar la purificación. Por ejemplo, un constructo puede incluir un polipéptido que codifica una secuencia de ácido nucleico unida a seis residuos de histidina seguidos de una tioredoxina, un sitio de escisión de enteroquinasa (véase, por ejemplo, Williams (1995) *Biochemistry* 34: 1787-97), y un dominio de translocación en el extremo terminal C. Los residuos de histidina facilitan la detección y la purificación, mientras que el sitio de escisión de la enteroquinasa proporciona un medio para purificar la proteína o proteínas deseadas del resto de la proteína de fusión. La tecnología relacionada con los vectores que codifican proteínas de fusión y la aplicación de proteínas de fusión están bien descritas en la literatura científica y de patentes. Véase, por ejemplo, Kroll (1993) *DNA Cell. Biol.* 12: 441-53.

30 Sistemas para la expresión recombinante de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1

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

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

50 Para permitir la expresión celular de los polinucleótidos de la presente invención, se puede usar un constructo de ácido nucleico, que incluye al menos una región codificante de una de las secuencias de ácido nucleico anteriores, e incluye además al menos un elemento regulador que actúa en cis. Preferiblemente, el promotor utilizado por el constructo de ácido nucleico de la presente invención es activo en la población celular específica transformada. Los ejemplos de promotores específicos de tipo celular y/o específicos de tejido son bien conocidos en la técnica. Véase Bernardi (2003) [Ed.] *Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells* Volumen 38 Elsevier Science B.V. El constructo de ácido nucleico puede incluir además un potenciador, que puede ser adyacente o distante a la secuencia promotora y puede funcionar sobrerregulando la transcripción del mismo.

El constructo de ácido nucleico puede incluir además preferiblemente un marcador seleccionable y/o un origen de replicación apropiado. Preferiblemente, el constructo de ácido nucleico utilizado es un vector lanzadera, que puede

propagarse tanto en *E. coli* (en donde el constructo comprende un marcador seleccionable y el origen de replicación apropiados) y ser compatible para la propagación en células, o la integración en un gen y un tejido de elección. El constructo puede ser, por ejemplo, un plásmido, un bácmido, un fagémido, un cósmido, un fago, un virus o un cromosoma artificial.

- 5 Los ejemplos de constructos adecuados incluyen, pero no se limitan a, pcDNA3, pcDNA3.1 (+/-), pGL3, PzeoSV2 (+/-), pDisplay, pEF/myc/cyto, pCMV/myc/cyto cada uno de los cuales se encuentra disponible comercialmente a través de en Invitrogen Co. (Carlsbad, CA.) Los ejemplos de vectores retrovirales y sistemas de empaque son aquellos vendidos por Clontech (San Diego, CA.), incluidos los vectores Retro-X pLNCX y pLXSN, que permiten la clonación en múltiples sitios de clonación y el transgén se transcribe a partir del promotor CMV. Los vectores derivados de Mo-MuLV también se incluyen como pBabe, donde el transgén se transcribirá a partir del promotor 5'LTR.

10 Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas con base en las células huésped que se utilizarán para la expresión, que está unida operativamente a la secuencia de ácido nucleico que se va a expresar. Dentro de un vector de expresión recombinante, "operativamente enlazado" significa que la secuencia de nucleótidos de interés está enlazada a la secuencia o secuencias reguladoras de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

15 El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Dichas secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Prensa Académica, San Diego, CA. Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos solo en ciertas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se va a transformar, y el nivel de expresión de la proteína deseada. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de este modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas de fusión o péptidos, codificados por ácidos nucleicos como se describe en el presente documento.

20 Los vectores de expresión recombinantes de la invención pueden diseñarse para la producción de proteínas variantes en células procariontas o eucariotas. Por ejemplo, las proteínas de la invención se pueden expresar en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insecto (por ejemplo, utilizando vectores de expresión de baculovirus), células de levadura o células de mamíferos. Las células huésped adecuadas se discuten con más detalle Goeddel (1990) Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA. Alternativamente, el vector de expresión recombinante se puede transcribir y traducir *in vitro*, por ejemplo, utilizando secuencias reguladoras del promotor T7 y la polimerasa T7.

25 La expresión de proteínas en procariontas se lleva a cabo con mayor frecuencia en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas de fusión o no de fusión. Los vectores de fusión agregan una cantidad de aminoácidos a una proteína codificada en los mismos, al amino o al extremo terminal C de la proteína recombinante. Dichos vectores de fusión sirven típicamente para tres propósitos: (i) aumentar la expresión de la proteína recombinante; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como un ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en los vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión de la fracción de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante de la fracción esto de fusión después de la purificación de la proteína de fusión. Dichas enzimas, y sus secuencias de reconocimiento afines, incluyen el Factor Xa, trombina, PreScission, TEV y enteroquinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc.; Smith y Johnson (1988) Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) que fusionan el glutatión S- transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante objetivo.

30 El vector de expresión recombinante de mamífero es capaz de dirigir la expresión del ácido nucleico que puede estar en un tipo de célula particular (por ejemplo, se usan elementos reguladores específicos de tejido para expresar el ácido nucleico). Los elementos reguladores específicos de tejido son conocidos en la técnica. Para una producción eficiente de la proteína, es preferible colocar las secuencias de nucleótidos que codifican la proteína de la invención bajo el control de secuencias de control de la expresión optimizadas para la expresión en un huésped deseado. Por ejemplo, las secuencias pueden incluir secuencias reguladoras transcripcionales y/o de traducción optimizadas (por ejemplo, secuencias Kozak alteradas).

35 Una estrategia para maximizar la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad disminuida para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman (1990) Gene Expression Technology: Methods in Enzymology Academic Press, San Diego, Calif. 185: 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que se insertará en un vector de expresión para que los codones individuales para cada aminoácido sean los utilizados preferentemente en *E. coli*.

Véase, por ejemplo, Wada, et al., (1992) Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118. Tal alteración de las secuencias de ácido nucleico de la invención se puede llevar a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN estándar. Otra estrategia para resolver el sesgo del codón es mediante el uso de cepas bacterianas BL21-codon plus (Invitrogen) o cepas bacterianas Rosetta (Novagen), estas cepas contienen copias adicionales de genes raros de ARNt de *E. coli*.

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

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

15 Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory.

20

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, la proteína de la invención puede producirse en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, células de levadura, planta o mamífero (por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células COS, HEK293). Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

- 25 El ADN del vector puede introducirse en células procariotas o eucariotas mediante técnicas convencionales de transformación o transfección. Como se usa en el presente documento, los términos "transformación" y "transfección" pretende referirse a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo precipitación conjunta con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Los métodos adecuados para transformar o
- 30 transfectar células huésped se pueden encontrar en Sambrook, et al. (2001) [Eds.] Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory y otros manuales de laboratorio.

Se puede usar cualquiera de los procedimientos bien conocidos para introducir secuencias de nucleótidos foráneas en células huésped. Estos incluyen el uso de transfección con fosfato de calcio, polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, liposomas, microinyección, vectores de plasma, vectores virales y cualquiera de los otros métodos bien conocidos para introducir ADN genómico clonado, ADNc, ADN sintético u otro material genético foráneo en un

35 célula huésped. Véase, por ejemplo, Sambrook, et al. (2001) (Eds.) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3a Ed.) Cold Spring Harbor Laboratory y Walker & Papley (2009) Molecular Biology and Biotechnology [5a Ed.] Royal Society of Chemistry. Solo es necesario que el procedimiento de ingeniería genética particular utilizado sea capaz de introducir con éxito al menos una molécula de ácido nucleico en la célula huésped capaz de expresar el peptidomimético del

40 epítipo NPC-1.

Para transfección estable de células de mamíferos, se sabe que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección utilizada, solo una pequeña fracción de las células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a los antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Varios marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a los medicamentos, como G418, higromicina, puromicina, blasticidina y metotrexato. Los ácidos nucleicos que codifican un marcador seleccionable pueden introducirse en una célula huésped en el mismo vector que la proteína codificante de la invención o pueden introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante la selección del fármaco (por ejemplo, las células que han incorporado el gen marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

45

50

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) la proteína de la invención. Por consiguiente, se describen métodos para producir proteínas de la invención usando las células huésped de la invención. El método comprende cultivar la célula huésped de la presente invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica la proteína de la invención) en un medio adecuado de tal manera que se produzca la proteína de la invención. El método comprende además aislar la proteína de la invención del medio o la célula huésped.

55

Después de que el vector de expresión se introduce en las células, las células transfectadas se cultivan en condiciones que favorecen la expresión del receptor, fragmento o variante de interés, que luego se recupera del cultivo utilizando técnicas estándar. Ejemplos de tales técnicas son bien conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el documento

WO 00/06593.

Etiquetas

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden modificarse después de la traducción para agregar fracciones efectoras tales como enlazadores químicos, fracciones detectables tales como, por ejemplo, tintes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, fracciones quimioluminiscentes, un agente citotóxico, materiales radiactivos, o fracciones funcionales.

Una amplia variedad de entidades, por ejemplo, ligandos, pueden acoplarse a los oligonucleótidos como se conoce en la técnica. Los ligandos pueden incluir moléculas naturales o moléculas recombinantes o sintéticas. Los ejemplos de ligandos incluyen, pero no se limitan a, avidina, biotina, péptidos, peptidomiméticos, polilisina (PLL), polietilenglicol (PEG), mPEG, grupos catiónicos, espermina, espermidina, poliamina, tiotropina, melanotropina, lectina, glicoproteína, proteína tensoactiva A, mucina, poliaminoácidos glicosilados, transferrina, aptámero, inmunoglobulinas (por ejemplo, anticuerpos), insulina, transferrina, albúmina, azúcar, moléculas lipofílicas (por ejemplo, esteroides, ácidos biliares, colesterol, ácido cólico y ácidos grasos), vitamina A, vitamina E, vitamina K, vitamina B, ácido fólico, B12, riboflavina, biotina, piridoxal, cofactores de vitaminas, lipopolisacáridos, hormonas y receptores hormonales, lectinas, carbohidratos, carbohidratos multivalentes, marcadores etiquetados en forma radioactiva, tintes fluorescentes y derivados de los mismos. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 6.153.737; 6.172.208; 6.300.319; 6.335.434; 6.335.437; 6.395.437; 6.444.806; 6.486.308; 6.525.031 ; 6.528.631; y 6.559.279.

Adicionalmente, se pueden agregar fracciones al peptidomimético del epítipo NPC-1 para aumentar la semivida *in vivo* (por ejemplo, alargando el tiempo hasta la eliminación de la corriente sanguínea). Dichas técnicas incluyen, por ejemplo, la adición de restos PEG (también llamada pegilación), y son bien conocidos en la técnica. Véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. No. 2003/0031671.

Un peptidomimético, anticuerpo, fragmento de unión o antígeno de los mismos, descritos en el presente documento puede estar "unido" a un sustrato cuando está asociado con el marcador sólido a través de una interacción química o física no aleatoria. La unión puede ser a través de un enlace covalente. Sin embargo, las uniones no deben ser covalentes o permanentes. Los materiales se pueden unir a una etiqueta a través de una "molécula espaciadora" o "grupo enlazador". Dichas moléculas espaciadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une a la etiqueta. De este modo, cuando se une a la etiqueta, la molécula espaciadora separa la etiqueta y los materiales biológicos, pero se une a ambos. Los métodos para unir material biológico (por ejemplo, una etiqueta) a una etiqueta son bien conocidos en la técnica e incluyen, entre otros, el acoplamiento químico.

Etiquetas Detectables

El peptidomimético del epítipo NPC-1 descrito en el presente documento puede modificarse después de la traducción para agregar etiquetas efectoras tales como enlazadores químicos, etiquetas detectables tales como, por ejemplo, tintes fluorescentes, enzimas, sustratos, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos y etiquetas quimioluminiscentes, y marcadores funcionales como, por ejemplo, estreptavidina, avidina, biotina, una citotoxina, un agente citotóxico y materiales radiactivos. Otros ejemplos de enzimas incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano picante, acetilcolinesterasa, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa y luciferasa. Otros ejemplos de materiales fluorescentes incluyen, pero no se limitan a, rodamina, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, umbeliferona, diclorotriazinilamina, ficoeritrina y cloruro de dansilo. Otros ejemplos de etiquetas quimioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luminol. Otros ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen, pero no se limitan a, luciferina y aequorina. Otros ejemplos de materiales radiactivos incluyen, pero no se limitan a, bismuto 213 (^{213}Bs), carbono 14 (^{14}C), carbono 11 (^{11}C), cloro 18 (^{18}Cl), cromo 51 (^{51}Cr), cobalto 57 (^{57}Co), cobalto 60 (^{60}Co), cobre 64 (^{64}Cu), cobre 67 (^{67}Cu), disprosio 165 (^{165}Dy), erbio 169 (^{169}Er), flúor 18 (^{18}F), galio 67 (^{67}Ga), galio 68 (^{68}Ga), germanio 68 (^{68}Ge), holmio 166 (^{166}Ho), indio 111 (^{111}In), yodo 125 (^{125}I), yodo 123 (^{123}I), yodo 124 (^{124}I), yodo 131 (^{131}I), iridio 192 (^{192}Ir), hierro 59 (^{59}Fe), criptón 81 (^{81}Kr), plomo 212 (^{212}Pb), lutecio 177 (^{177}Lu), molibdeno 99 (^{99}Mo), nitrógeno 13 (^{13}N), oxígeno 15 (^{15}O), paladio 103 (^{103}Pd), fósforo 32 (^{32}P), potasio 42 (^{42}K), renio 186 (^{186}Re), renio 188 (^{188}Re), rubidio 81 (^{81}Rb), rubidio 82 (^{82}Rb), samario 153 (^{153}Sm), selenio 75 (^{75}Se), sodio 24 (^{24}Na), estroncio 82 (^{82}Sr), estroncio 89 (^{89}Sr), azufre 35 (^{35}S), tecnecio 99m (^{99}Tc), talio 201 (^{201}Tl), tritio (^3H), xenón 133 (^{133}Xe), iterbio 169 (^{169}Yb), iterbio 177 (^{177}Yb), y el itrio 90 (^{90}Y).

Agentes citotóxicos

El peptidomimético del epítipo de la NPC-1 descrito en el presente documento puede conjugarse con agentes citotóxicos que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, aminopterina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina; agentes alquilantes, tales como mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU), mitomicina C, lomustina (CCNU), 1-metilnitrosourea, ciclofosfamida, mecloretamina, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino y carboplatino (paraplatino); las antraciclinas incluyen daunorrubicina (antes daunomicina), doxorubicina (adriamicina), detorrubicina, carminomicina, idarrubicina, epirubicina, mitoxantrona y bisantreno; los antibióticos incluyen dactinomicina (actinomicina D), bleomicina, caliqueamicina, mitramicina y antramycin (AMC); y agentes antimicóticos

tales como los alcaloides de la vinca, vincristina y vinblastina. Otros agentes citotóxicos incluyen paclitaxel (TAXOL®), ricina, exotoxina de *Pseudomonas*, gemcitabina, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, etopósido, tenopósido, colchicina, dihidroxi antracino diona, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina, procarbazona, hidroxurea, asparaginasa, corticosteroides, mitotano (O,P'-(DDD)), interferones y mezclas de estos agentes citotóxicos.

Los agentes citotóxicos adicionales incluyen, pero no se limitan a, agentes quimioterapéuticos tales como carboplatino, cisplatino, paclitaxel, gemcitabina, caliqueamicina, doxorubicina, 5-fluorouracilo, mitomicina C, actinomicina D, ciclofosfamida, vincristina, bleomicina, antagonistas de VEGF, antagonistas de EGFR, platinos, taxoles, irinotecano, 5-fluorouracilo, gemcitabina, leucovorina, esteroides, ciclofosfamida, melfalán, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vinblastina, vincristina, vindesina y vinorelbina), mustinas, inhibidores de tirosina quinasa, radioterapia, antagonistas de hormona sexual, moduladores selectivos del receptor de andrógeno, moduladores selectivos del receptor de estrógeno, antagonistas de PDGF, antagonistas de TNF, antagonistas de IL-1, interleuquinas (por ejemplo, IL-12 o IL-2), antagonistas de IL-12R, anticuerpos monoclonales conjugados con toxina, anticuerpos monoclonales específicos de antígeno tumoral, Erbitux®, Avastin®, Pertuzumab, anticuerpos anti-CD20, Rituxan®, ocrelizumab, ofatumumab, DXL625, Herceptin®, o cualquier combinación de los mismos. Las enzimas tóxicas de plantas y bacterias tales como ricina, la toxina de la difteria y la toxina de *Pseudomonas* pueden conjugarse con los anticuerpos humanizados, o fragmentos de unión de los mismos, para generar reactivos que matan un tipo específico de célula. Youle, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU. 77: 5483; Gilliland, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU. 77: 4539; Krollick, et al. (1980) Proc. Nat'l Acad. Sci. EE. UU. 77: 5419. Otros agentes citotóxicos incluyen ribonucleasas citotóxicas. Véase la patente de Estados Unidos No. 6.653.104.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden conjugarse con un radionúclido que emite partículas alfa o beta (por ejemplo, radioinmunoconjugados). Dichos isótopos radiactivos incluyen, entre otros, emisores beta, tales como fósforo 32 (³²P), escandio 47 (⁴⁷Sc), cobre 67 (⁶⁷Cu), galio 67 (⁶⁷Ga), itrio 88 (⁸⁸Y), itrio 90 (⁹⁰Y), yodo 125 (¹²⁵I), yodo 131 (¹³¹I), samario 153 (¹⁵³Sm), lutecio 177 (¹⁷⁷Lu), renio 186 (¹⁸⁶Re), renio 188 (¹⁸⁸Re), y emisores alfa tales como astatino 211 (²¹¹At), plomo 212 (²¹²Pb), bismuto 212 (²¹²Bi), bismuto 213 (²¹³Bi) o actinio 225 (²²⁵Ac).

Los métodos son conocidos en la técnica para la conjugación de peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento con una etiqueta, tal como los métodos descritos por Hunter, et al. (1962) Nature 144: 945; David, et al. (1974) Biochemistry 13: 1014; Pain, et al. (1981) J. Immunol. Meth 40: 219; y Nygren (1982) Histochem, y Cytochem. 30: 407.

Sustratos

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden unirse a un sustrato. Varios sustratos (por ejemplo, soportes sólidos) conocidos en la técnica son adecuados para su uso con los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento. El sustrato puede ser modificado para contener canales u otras configuraciones. Véase Fung (2004) [Ed.] Protein Arrays: Methods and Protocols Humana Press y Kambhampati (2004) [Ed.] Protein Microarray Technology John Wiley & Sons.

Los materiales del sustrato incluyen, pero no se limitan a, acrílicos, agarosa, vidrio borosilicato, carbono (por ejemplo, láminas o gránulos de nanofibras de carbono), acetato de celulosa, celulosa, cerámicas, geles, vidrio (por ejemplo, vidrio inorgánico, de poro controlado, modificado, sosa-cal, o con grupos funcionales), látex, perlas magnéticas, membranas, metales, metaloides, nitrocelulosa, NYLON®, haces de fibras ópticas, polímeros orgánicos, papel, plásticos, poli(acrilato de metilmetacrilato), poli(4-metilbuteno), poli(tereftalato de etileno), poli(butirato de vinilo), poli(acrilamida), polibutileno, policarbonato, polietileno, tereftalato de polietilenglicol, poliformaldehído, polimetacrilato, polimetilmetacrilato, polipropileno, polisacáridos, poliestireno, poliuretanos, polivinilacetato, polivinilcloruro, polivinilideno difluoruro (PVDF), polivinilpirrolidona, rayón, resinas, cauchos, materiales semiconductores, SEPHAROSE®, sílice, silicio, copolímeros de estireno, TEFLON® y una variedad de otros polímeros.

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

El cuerpo del sustrato puede tener la forma de una perla, caja, columna, cilindro, disco, placa (por ejemplo, placa de vidrio, placa de PETRI), fibra, película, filtro, placa de microtitulación (por ejemplo, placa de microtitulación de 96 pozos), barra de paletas múltiples, red, granulo, placa, anillo, varilla, rollo, lámina, platina, barra, bandeja, tubo o vial. El sustrato puede ser un cuerpo discreto singular (por ejemplo, un solo tubo, una sola perla), cualquier número de una pluralidad de cuerpos de sustrato (por ejemplo, un estante de 10 tubos, varias perlas), o combinaciones de los mismos (por ejemplo, una bandeja comprende una pluralidad de placas de microtitulación, una columna llena de perlas, una placa de microtitulación llena de perlas).

Un epítipo peptidomimético NPC-1 puede estar "unido" a un sustrato cuando está asociado con el sustrato sólido a través de una interacción química o física no aleatoria. La unión puede ser a través de un enlace covalente. Sin

embargo, las uniones no necesitan ser covalentes o permanentes. Los materiales pueden estar unidos a un sustrato a través de una "molécula espaciadora" o "grupo enlazador". Dichas moléculas espaciadoras son moléculas que tienen una primera porción que se une al material biológico y una segunda porción que se une al sustrato. De este modo, cuando se une al sustrato, la molécula espaciadora separa el sustrato y los materiales biológicos, pero se une a ambos.

5 Los métodos para unir material biológico (por ejemplo, etiqueta) a un sustrato son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, el acoplamiento químico.

Se pueden usar placas, tales como placas de microtitulación, que soportan y contienen la fase sólida para reacciones de síntesis en fase sólida. Las placas de microtitulación pueden albergar perlas que se utilizan como la fase sólida. Por "partícula" o "micropartícula" o "nanopartícula" o "perla" o "microperla" o "microesfera" en el presente documento se entiende material en micropartículas que tiene cualquiera de una variedad de formas o tamaños. La forma puede ser generalmente esférica pero no necesita ser esférica, siendo, por ejemplo, cilíndrica o poliédrica. Como apreciarán los expertos en la técnica, las partículas pueden comprender una amplia variedad de materiales dependiendo de su uso, que incluyen, entre otros, almidón entrecruzado, dextranos, celulosa, proteínas, polímeros orgánicos que incluyen polímeros de estireno, tales como poliestireno, y metilestireno, así como otros copolímeros de estireno, plásticos, vidrio, cerámica, polímeros acrílicos, materiales magnéticamente sensibles, coloides, thoria sol, grafito de carbono, dióxido de titanio, nailon, látex y TEFLON®. Véase, por ejemplo, la "Microsphere Detection Guide" de Bangs Laboratories, Fishers, IN.

10

15

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento se pueden unir a cualquiera de las formas de los sustratos descritos en este documento (por ejemplo, perla, caja, columna, cilindro, disco, placa (por ejemplo, placa de vidrio, placa de PETRI), fibra, película, filtro, placa de microtitulación (por ejemplo, placa de microtitulación 96-pozos), varilla de múltiples hojas, red, granulo, placa, anillo, varilla, rollo, lámina, platina, barra, bandeja, tubo, o vial). En particular, las partículas o perlas pueden ser un componente de un material gelificante o pueden ser componentes separados tales como perlas de látex hechas de una variedad de plásticos sintéticos (por ejemplo, poliestireno). La etiqueta (por ejemplo, estreptavidina) puede estar unida a un sustrato (por ejemplo, perla).

20

25 Composiciones farmacéuticas

Una "composición farmacéutica" se refiere a una composición química o biológica adecuada para administración a un mamífero. Dichas composiciones pueden formularse específicamente para administración a través de una o más de varias rutas, que incluyen, entre otras, bucal, epicutánea, epidural, inhalación, intraarterial, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, rectal a través de un enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosal. Además, la administración puede hacerse por medio de inyección, polvo, líquido, gel, gotas u otros medios de administración.

30

Un "excipiente farmacéutico" o un "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un vehículo, generalmente un líquido, en el que se formula un agente terapéutico activo. Se describe un agente terapéutico activo que es un anticuerpo humanizado, o uno o más fragmentos del mismo. El excipiente generalmente no proporciona ninguna actividad farmacológica de la formulación, aunque puede proporcionar estabilidad química y/o biológica y características de liberación. Los ejemplos de formulaciones se pueden encontrar, por ejemplo, en Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21a Ed.]

35

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

40

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento se pueden formular en composiciones farmacéuticas de diversas formas de dosificación. Para preparar las composiciones farmacéuticas de la invención, al menos un peptidomimético del epítipo NPC-1 como ingrediente activo puede mezclarse íntimamente con vehículos y aditivos apropiados de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica de las formulaciones farmacéuticas. Véase Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21a Ed.]. Por ejemplo, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en este documento pueden formularse en solución salina regulada con fosfato pH 7,2 y suministrarse como una solución líquida incolora transparente de 5,0 mg/mL.

45

50

De manera similar, las composiciones para preparaciones líquidas incluyen soluciones, emulsiones, dispersiones, suspensiones, jarabes y elixires, con vehículos y aditivos adecuados que incluyen, entre otros, agua, alcoholes, aceites, glicoles, conservantes, agentes saborizantes, agentes colorantes y agentes de suspensión.

Las preparaciones típicas para administración parenteral comprenden el ingrediente activo con un vehículo tal como agua estéril o aceite parenteralmente aceptable que incluye, entre otros, polietilenglicol, polivinil pirrolidona, lecitina, aceite de cacahuete o aceite de sésamo, con otros aditivos para ayudar a la solubilidad o conservación. En el caso de una solución, se puede liofilizar hasta obtener un polvo y luego reconstituirse inmediatamente antes de su uso. Para dispersiones y suspensiones, los vehículos y aditivos apropiados incluyen gomas acuosas, celulosas, silicatos o

55

aceites.

Para cada una de las realizaciones citadas, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden administrar por una variedad de formas de dosificación. Se contempla cualquier forma de dosificación biológicamente aceptable conocida por los expertos en la técnica y sus combinaciones. Los ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, sin limitación, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, cápsulas, inhalantes, inhalantes en aerosol, parches, inhalantes en partículas, implantes, implantes con depósito, inyectables (incluidos subcutáneo, intramuscular, intravenoso e intradérmica), infusiones y combinaciones de los mismos.

En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede realizar incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina. Además, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse en una formulación de liberación prolongada, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden preparar con vehículos que protejan al compuesto contra la liberación rápida, como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de vinileno, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, ácido poliláctico y polilácticos, copolímeros poliglicólicos (PLG). Los expertos en la técnica conocen muchos métodos para la preparación de tales formulaciones.

Opcionalmente, los adyuvantes también se pueden incluir en una composición. Los adyuvantes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a: (1) sales de aluminio (alumbre), tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, sulfato de aluminio, etc.; (2) formulaciones de emulsión de aceite en agua (con o sin otros agentes inmunoestimulantes específicos); (3) se pueden usar adyuvantes de saponina, tales como QS21, o partículas generadas a partir de ellos, tales como ISCOM (complejos inmunoestimulantes); (4) adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante incompleto de Freund (IFA), (5) citoquinas, tales como interleuquinas (IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12), interferones (por ejemplo, interferón gamma), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor de necrosis tumoral (TNF); (6) mutantes detoxificados de una toxina ribosilante de ADP bacteriana, tal como una toxina del cólera (CT), una toxina de pertussis (PT), o una toxina termolábil de *E. coli* (LT); (7) MPL o MPL 3-O-desacilada (3dMPL); (8) combinaciones de 3dMPL con, por ejemplo, QS21 y/o emulsiones de aceite-en agua (9) oligonucleótidos que comprenden motivos CpG; (10) un éter de polioxietileno o un éster de polioxietileno; (11) un tensioactivo éster de polioxietilén sorbitán en combinación con un octoxinol o un tensioactivo de polioxietileno de alquiléster o éter en combinación con al menos un tensioactivo no iónico adicional, tal como un octoxinol; (12) una saponina y un oligonucleótido inmunoestimulador tal como un oligonucleótido CpG; (13) un inmunoestimulante y una partícula de sal metálica; y (14) otras sustancias que actúan como agentes inmunoestimulantes para mejorar la efectividad de la composición.

Como se describe en el presente documento, una composición antigénica puede provocar una "respuesta inmunológica" a un antígeno o composición, que es el desarrollo en un sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a un antígeno presente en la composición de interés. Para los propósitos de la presente invención, una "respuesta inmune humoral" se refiere en términos generales a una respuesta inmune mediada por moléculas de anticuerpos, mientras que una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T y/u otros glóbulos blancos. Un aspecto importante de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de las células T citotóxicas ("CTL"). Las CTL tienen especificidad por los antígenos peptídicos que se presentan en asociación con proteínas codificadas por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresan en las superficies de las células. Las CTL ayudan a inducir y promover la destrucción de microbios intracelulares, o la lisis de células infectadas con tales microbios. Otro aspecto de la inmunidad celular implica una respuesta específica de antígeno por parte de las células T auxiliares. Las células T auxiliares actúan para ayudar a estimular la función y centran la actividad de las células efectoras no específicas contra células que muestran antígenos peptídicos en asociación con moléculas del MHC en su superficie. Una "respuesta inmune celular" también se refiere a la producción de citoquinas, quimioquinas y otras moléculas similares producidas por células T activadas y/u otras células blancas de la sangre, incluidas las derivadas de células T CD4+ y CD8+.

Una composición o vacuna que provoca una respuesta inmune celular puede servir para sensibilizar a un sujeto vertebrado mediante la presentación de un antígeno en asociación con moléculas del MHC en la superficie celular. La respuesta inmune mediada por células se dirige a, o cerca de, las células que presentan antígeno en su superficie. Además, se pueden generar linfocitos T específicos de antígeno para permitir la protección futura de un huésped inmunizado.

La capacidad de un inmunógeno particular para estimular una respuesta inmunológica mediada por células puede determinarse mediante una serie de ensayos, tal como los ensayos de linfoproliferación (activación de linfocitos), los ensayos de células citotóxicas CTL o el ensayo de linfocitos T específicos para el antígeno en un sujeto sensibilizado. Tales ensayos son bien conocidos en la técnica. Los métodos para medir la respuesta inmunitaria mediada por células incluyen la medición de citoquinas intracelulares o la secreción de citoquinas por poblaciones de células T, o por medición de células T específicas del epítipo.

Por consiguiente, el término "composición inmunogénica" como se usa en el presente documento se refiere en

términos generales a una composición que comprende una molécula antigénica en la que la administración de la composición a un sujeto da como resultado el desarrollo en el sujeto de una respuesta inmune humoral y/o celular a la molécula antigénica de interés. La composición inmunogénica puede introducirse directamente en un sujeto receptor, tal como por inyección, inhalación, administración oral, intranasal y mucosa (por ejemplo, intra-rectal o intra-vaginal).

Por ejemplo, la composición puede ser una composición antigénica o una composición inmunogénica. Las composiciones descritas en este documento pueden comprender al menos un excipiente, vehículo o adyuvante. Además, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser una composición farmacéutica. En otra realización más, la composición comprende un vehículo farmacéutico. La composición puede provocar una respuesta inmune. La respuesta inmune puede ser una respuesta inmune protectora. La composición puede provocar una respuesta inmune humoral, en la que dicha respuesta inmune humoral puede ser específica para el epítipo NPC-1. La composición puede provocar una respuesta inmune celular, en la que dicha respuesta inmune celular puede ser específica para el epítipo NPC-1. Por ejemplo, una composición antigénica que comprende un peptidomimético del epítipo NPC-1 puede administrarse a un mamífero que provoca una respuesta inmune que incluye la producción de anticuerpos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1. Estos anticuerpos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 pueden, a su vez, actuar para unirse y desencadenar la eliminación inmunológica (por ejemplo, lisis) de células tumorales que expresan un epítipo NPC-1.

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

Rutas de administración

Las composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en cualquiera de las siguientes rutas: bucal, epicutánea, epidural, infusión, inhalación, intraarterial, intracardíaca intracerebro ventricular, intradérmica, intramuscular, intranasal, intraocular, intraperitoneal, intraespinal, intratecal, intravenosa, oral, parenteral, pulmonar, rectal vía enema o supositorio, subcutánea, subdérmica, sublingual, transdérmica y transmucosa. Las rutas preferidas de administración son la inyección o infusión intravenosa. La administración puede ser local, cuando la composición se administra directamente, cerca a, en el sitio, cerca, en, cerca o cerca del sitio o sitios de la enfermedad, por ejemplo, tumor; o sistémica, cuando la composición se administra al paciente y pasa a través del cuerpo en términos generales, alcanzando así el sitio o sitios de la enfermedad. La administración local (por ejemplo, la inyección) se puede realizar mediante la administración a la célula, tejido, órgano y/o sistema de órganos, que abarca y/o se ve afectado por la enfermedad, y/o cuando los signos y/o síntomas de la enfermedad son activos o es probable que ocurra (por ejemplo, el sitio del tumor). La administración puede ser tópica con un efecto local, la composición se aplica directamente donde se desea su acción (por ejemplo, el sitio del tumor).

Para cada una de las realizaciones citadas, los compuestos pueden administrarse mediante una variedad de formas de dosificación como se conoce en la técnica. Se contempla cualquier forma de dosificación biológicamente aceptable conocida por los expertos en la técnica y sus combinaciones. Ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, sin limitación, tabletas masticables, tabletas de disolución rápida, tabletas efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, tabletas, tabletas de múltiples capas, tabletas de dos capas, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, pastillas para chupar, grageas, pastillas masticables, perlas, polvos, goma, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, cápsula lisa, duchas, supositorios, cremas, tópicos, inhalantes, inhalantes en aerosol, parches, inhalantes en partículas, implantes, implantes con depósito, productos ingestibles, inyectables (incluso subcutáneos, intramusculares, intravenosos e intradérmicos), infusiones y combinaciones de los mismos.

Otros compuestos que pueden incluirse por mezcla son, por ejemplo, ingredientes médicamente inertes (por ejemplo, diluyente sólido y líquido), como lactosa, dextrosa-sacarosa, celulosa, almidón o fosfato de calcio para tabletas o cápsulas, aceite de oliva u oleato de etilo, para cápsulas blandas y agua o aceite vegetal para suspensiones o emulsiones; agentes lubricantes tales como sílice, talco, ácido esteárico, estearato de magnesio o calcio y/o polietilenglicoles; agentes gelificantes tales como arcillas coloidales; agentes espesantes tales como goma tragacanto o alginato de sodio, agentes aglutinantes tales como almidones, gomas arábicas, gelatina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o polivinilpirrolidona; agentes disgregantes tales como almidón, ácido algínico, alginatos o glicolato de almidón sódico; mezclas efervescentes; colorantes; edulcorantes; agentes humectantes tales como lecitina, polisorbatos o laurilsulfatos; y otros ingredientes accesorios terapéuticamente aceptables, tales como humectantes, conservantes, reguladores y antioxidantes, que son aditivos conocidos para tales formulaciones.

Las dispersiones líquidas para administración oral pueden ser jarabes, emulsiones, soluciones o suspensiones. Los jarabes pueden contener como vehículo, por ejemplo, sacarosa o sacarosa con glicerol y/o manitol y/o sorbitol. Las suspensiones y las emulsiones pueden contener un vehículo, por ejemplo, goma natural, agar, alginato de sodio, pectina, metilcelulosa, carboximetilcelulosa o alcohol polivinílico. También se describen kits que incluyen uno o más

recipientes que comprenden unidades de dosificación farmacéutica que comprenden una cantidad eficaz de uno o más anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención. Los kits pueden incluir instrucciones, indicaciones, etiquetas, información de marketing, advertencias o folletos de información.

Dosificaciones

5 La cantidad de peptidomiméticos del epítipo NPC-1 en una composición terapéutica de acuerdo con cualquier realización de esta invención puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el género, el peso, el historial del paciente, los factores de riesgo, la predisposición a la enfermedad, la ruta de administración, el régimen de tratamiento preexistente (por ejemplo, posibles interacciones con otros medicamentos) y el peso del individuo. Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica
10 óptima. Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo, o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según lo indiquen las exigencias de la situación terapéutica.

Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma unitaria de dosificación como se usa en este documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpos, y fragmentos de los mismos, calculados para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas unitarias de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas de los anticuerpos, y de sus fragmentos, y del efecto terapéutico particular que se debe lograr, y de las limitaciones inherentes a la técnica de composición de dichos anticuerpos y fragmentos de los mismos, para el tratamiento de la sensibilidad en individuos. En el uso terapéutico para el tratamiento de afecciones en mamíferos (por ejemplo, seres humanos) para los cuales los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención o una composición farmacéutica apropiada de los mismos son eficaces, los anticuerpos y fragmentos de los mismos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad eficaz. Las dosis adecuadas para esta invención pueden ser una composición, una composición farmacéutica o cualquier otra composición descrita en el presente documento.
15
20
25

La dosis se puede administrar como una dosis única, una dosis doble, una dosis triple, una dosis cuádruple y/o una dosis quíntuple. Las dosis se pueden administrar de forma individual, simultánea y secuencial.

La forma de dosificación puede ser cualquier forma de liberación conocida por los expertos en la técnica. Las composiciones de la presente invención pueden formularse para proporcionar una liberación inmediata del ingrediente activo o una liberación sostenida o controlada del ingrediente activo. En una preparación de liberación sostenida o de liberación controlada, la liberación del ingrediente activo puede ocurrir a un ritmo tal que los niveles en sangre se mantengan dentro de un rango terapéutico pero por debajo de los niveles tóxicos durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, de 4 a 24 horas). Las formas de dosificación preferidas incluyen liberación inmediata, liberación prolongada, liberación por pulsos, liberación variable, liberación controlada, liberación temporizada, liberación sostenida, liberación retardada, acción prolongada y combinaciones de las mismas, y son conocidas en la técnica.
30
35

Se apreciará que la actividad farmacológica de las composiciones puede controlarse usando modelos farmacológicos estándar que se conocen en la técnica. Además, se apreciará que las composiciones que comprenden un péptido mimético del epítipo NPC-1 pueden incorporarse o encapsularse en una matriz polimérica o membrana adecuada para la administración específica al sitio, o pueden tener grupos funcionales con agentes de direccionamiento específicos capaces de efectuar la administración específica al sitio. Estas técnicas, así como otras técnicas de administración de fármacos son bien conocidas en la técnica. La determinación de las dosis óptimas para una situación particular está dentro de las capacidades de los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Grennaro (2005) [Ed.] Remington: The Science and Practice of Pharmacy [21a Ed.]
40

Métodos de tratamiento

45 Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento se pueden usar en métodos para tratar el cáncer, promover la regresión tumoral, destruir células tumorales, activar una respuesta inmune contra células tumorales que expresan el epítipo NPC-1 (por ejemplo, respuesta inmune citotóxica), activación de células dendrítica, o activación de inmunidad específica de antígeno, que comprende administrar una cantidad eficaz de un peptidomimético del epítipo NPC-1 del mismo a un sujeto que lo necesite. Además, el peptidomimético del epítipo NPC-1 descrito en el presente documento se puede usar para fabricar medicamentos para uso en el tratamiento del cáncer, promover la regresión tumoral, destruir células tumorales, activar una respuesta inmune contra células tumorales que expresan el epítipo NPC-1 (por ejemplo, respuesta inmune citotóxica), activar células dendríticas o activar la inmunidad específica de antígeno que comprende una cantidad eficaz de un peptidomimético del epítipo NPC-1 descrito en el presente documento. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento se pueden mezclar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para fabricar una composición para tratar cáncer, promover la regresión del tumor, matar las células tumorales, activar una respuesta inmune contra células tumorales que expresan el epítipo NPC-1 (por ejemplo, respuesta inmune citotóxica), la activación de células dendríticas, o activación de inmunidad específica de antígeno que comprende una cantidad eficaz de un peptidomimético del epítipo NPC-1 descrito en el presente documento.
50
55

El cáncer tratado por los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento pueden ser cáncer de pulmón, mama, páncreas, próstata, uterino, esofágico, colorrectal o hígado. El cáncer puede ser un cáncer en etapa 1, 2, 3 o 4. El cáncer puede haber hecho metástasis. El paciente puede ser un mamífero, tal como un ser humano, que padece cáncer en el que las células tumorales expresan epítipos de NPC-1, epítipos aberrantes de NPC-1 y/o tumorigénesis de células neoplásicas que expresan un epítipo NPC-1. La cantidad suficiente para inhibir o reducir el epítipo NPC-1 es una cantidad suficiente para mejorar el trastorno, que puede ser controlado como una disminución en la progresión del cáncer o en la masa tumoral.

El paciente puede expresar niveles detectables de epítipo NPC-1 como se detecta en una muestra de biopsia de tumor o en l sangre, heces, orina o fluido linfático. Véase la Figura 1. Además, el paciente puede estar en riesgo de cáncer o un paciente sin síntomas. Los métodos descritos en el presente documento pueden usarse en células, por ejemplo, células humanas, *in vitro* o *ex vivo*. Alternativamente, el método puede realizarse en células presentes en un sujeto como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico).

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden mezclarse con agentes quimioterapéuticos adicionales, agentes citotóxicos, anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales NEO-201 o NEO-301), linfoquina o factor de crecimiento hematopoyético. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 también se pueden administrar en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina, un agente citotóxico (por ejemplo, una fracción que inhibe ADN, ARN o la síntesis de proteínas, un radionúclido o una proteína inhibidora ribosomal, por ejemplo, ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹⁸⁸Re, ⁹⁰Y, vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antiviral de hierba carmín, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de la difteria, cadena de ricina A o enzima fosfolipasa citotóxica) agente inmunosupresor (por ejemplo, ciclosporina, leflunomida, metotrexato, azotiprina, mercaptopurina, dactinomicina, tacrolimus o sirolimus) o un factor de crecimiento hematopoyético. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden marcar con una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta paramagnética (por ejemplo, aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio), un agente de contraste para imágenes de contraste de IRM, etiqueta fluorescente, etiqueta bioluminiscente, o etiqueta radiactiva. En los métodos descritos en el presente documento, el segundo agente puede administrarse simultánea o secuencialmente con el anticuerpo.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 descritos en el presente documento se pueden usar en la fabricación de composiciones para uso en el tratamiento del cáncer y métodos de tratamiento del cáncer que incluyen, entre otros, tumores sólidos y blandos, tales como carcinoma esofágico, cáncer renal, cáncer de mama, tiroides, bazo, útero, riñón, colorrectal, pulmón, próstata, testículos, gástrico, páncreas, cuello uterino, hueso, piel, cerebro, cabeza y cuello, vejiga, cabeza y cuello, hígado, páncreas, melanoma, osteosarcoma, fibrosarcoma, rabdomiosarcoma, teratocarcinoma, neuroblastoma, glioma, glioblastoma y neoplasias hematológicas tales como leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, mieloma múltiple, linfoma de Hodgkin, y linfoma de no Hodgkin y en las que el cáncer es invasivo o metastásico.

También se describen métodos para tratar a un sujeto con cáncer de páncreas o de colon que comprende administrar peptidomiméticos del epítipo NPC-1 a un sujeto que puede estar recibiendo una terapia antihiperplásica secundaria. Los ejemplos de terapia antihiperplásica secundaria incluyen quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, fototerapia, crioterapia, terapia con toxinas, terapia hormonal o cirugía. Por lo tanto, se contempla el uso de los métodos y composiciones junto con terapias estándar contra el cáncer. El paciente a tratar puede ser de cualquier edad. Un experto en la técnica reconocerá la presencia y el desarrollo de otras terapias anticancerosas que pueden usarse en conjugación con los peptidomiméticos del epítipo NPC-1.

La determinación de la dosis está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden administrar para el tratamiento agudo, durante una semana o menos, a menudo durante un período de uno a tres días o se pueden usar en el tratamiento crónico, durante varios meses o años. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz de los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 es una cantidad suficiente para producir un cambio clínicamente significativo en la eliminación del epítipo NPC-1, la disminución de la progresión del cáncer o la disminución del tamaño del tumor.

Métodos de diagnóstico

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden usar en métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un epítipo NPC-1. Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden usarse en métodos que comprenden (a) poner en contacto una muestra de prueba con un anticuerpo, o fragmento del mismo, que se une a un peptidomimético del epítipo NPC-1, y (b) analizar los complejos anticuerpo-epítipo, en los que la presencia de dicho epítipo es indicativo de un carcinoma. Además, los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden usarse en un método para detectar la presencia de un epítipo NPC-1 en un paciente que comprende (a) administrar a dicho paciente un anticuerpo monoclonal marcado, o un fragmento del mismo, que se une a un peptidomimético del epítipo NPC-1 y (b) detección de la presencia de un epítipo NPC-1; en el que la presencia de dicho epítipo es indicativa de un carcinoma. El complejo anticuerpo-epítipo se puede detectar mediante Western blot, radioinmunoensayo, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayo tipo "sándwich", ensayo de inmunoprecipitación, reacción de precipitación, reacción de precipitación por difusión en gel, ensayo de inmunodifusión, ensayo de aglutinación, ensayo de fijación al complemento, ensayo inmunohistoquímico, inmunoensayo fluorescente e inmunoensayo de proteína A. La muestra puede ser una biopsia de tejido, linfa, orina, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado

inflamatorio, sangre, suero, heces o líquido extraído del tracto colorrectal.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden usar en métodos de diagnóstico para detectar la presencia o ausencia de un epítipo NPC-1, en el que la presencia del antígeno es indicativa de cáncer que incluye, entre otros, cáncer de pulmón, mama, páncreas, útero, esófago, colorrectal o hígado. Los métodos de diagnóstico pueden utilizarse con pacientes con riesgo de cáncer o pacientes sin síntomas.

Los anticuerpos que se unen selectivamente a un peptidomimético del epítipo NPC-1 pueden ser recombinantes. Los fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden ser un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, CDR, parátipo, o porción de un anticuerpo que es capaz de unirse al antígeno. Los anticuerpos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden ser quiméricos, humanizados, antiidiotípicos, de cadena única, bifuncionales o coespecíficos. Los anticuerpos que se unen selectivamente a peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden ser o fragmentos conjugados a una etiqueta, que incluye, entre otros, una etiqueta quimioluminiscente, etiqueta paramagnética (por ejemplo, aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio o galio), un agente de contraste de imágenes de IRM, etiqueta fluorescente, etiqueta bioluminiscente o etiqueta radiactiva.

Adicionalmente, los peptidomiméticos de epítipos NPC-1 se pueden unir a un soporte sólido (por ejemplo, perlas, tubos de ensayo, láminas, placas de cultivo o tiras reactivas), tal como una matriz.

El método puede detectar pólipos colorrectales. El método puede comprender además pruebas adicionales para la presencia de tumores que incluyen, entre otros, tumores benignos, tumores malignos, tumores metastásicos y tumores no metastásicos. Por ejemplo, el método de diagnóstico puede detectar células precancerosas que expresan un marcador celular que comprende detectar un epítipo NPC-1.

El método puede comprender la obtención de imágenes de un epítipo NPC-1 mediante tomografía por emisión de positrones (PET), sistema de monitorización con poca luz CCD, rayos X, tomografía computarizada, escintigrafía, imágenes fotoacústicas, tomografía computarizada de emisión de fotón único (SPECT), Imagen de resonancia magnética (IRM), ultrasonido, imagen paramagnética y tomografía de coherencia óptica endoscópica.

También se describe un método para diagnóstico genético de un riesgo de cáncer que comprende tomar una muestra de ácido nucleico de un paciente, analizar dicho ácido nucleico que comprende comparar con una secuencia MUC5AC específica de cáncer, en la que si la muestra de ácido nucleico del paciente coincide con la secuencia MUC5AC específica del cáncer, el paciente está en riesgo de desarrollar cáncer.

Los epítipos NPC-1 se pueden usar como biomarcadores de cáncer. La detección de epítipos NPC-1 en una muestra biológica, tal como suero de un sujeto, las células neoplásicas biopsiadas o muestra fecal, se puede realizar por medio de anticuerpos que se unen selectivamente a un peptidomimético del epítipo NPC-1. Por ejemplo, se obtiene una muestra biológica (por ejemplo, una muestra de tumor, suero o fecal) de un sujeto, luego se mide el epítipo NPC-1 (por ejemplo, mediante ELISA o PCR), y se compara con las muestras correspondientes de sujetos normales. Los métodos de medición incluyen cualquier método de detección de ácido nucleico, por ejemplo, hibridación *in situ* utilizando sondas antisentido de oligonucleótidos de ADN o ARNc del epítipo NPC-1, secuenciación de ultra alto rendimiento, tecnología de nanocuerdas, microarreglos, amplificación de círculo rodante, ligadura mediada por proximidad, PCR, qRT-PCR ChIP, ChIP-qPCR, o anticuerpos de unión al epítipo NPC-1. Los niveles comparativamente altos de epítipos NPC-1 indican la presencia y/o gravedad del cáncer de páncreas o colon, y pueden indicar metástasis o un mal pronóstico del cáncer.

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 pueden usarse en las técnicas SQUID (Dispositivo Superconductor de Interferencia Cuántica) para métodos de diagnóstico. La técnica SQUID comprende unir nanopartículas de óxido de hierro a los anticuerpos, que luego se inyectan en el paciente. Si hay un tumor presente, los anticuerpos con nanopartículas conjugadas reconocen y se unen al epítipo NPC-1 en las células tumorales. Véase, por ejemplo, Hao, et al. (2010) Journal of Physics 43: 474004. En un método SQUID, el paciente se rodea con bobinas magnéticas sensibles en un dispositivo superconductor de interferencia cuántica (SQUID). Se genera un campo magnético y todas las nanopartículas metálicas se alinean en una dirección. Cuando se rompe el campo magnético, las nanopartículas emiten una señal electromagnética mientras se relajan a su estado original. Al medir la intensidad de la señal, se puede decir cuántas partículas de metal, y por lo tanto, cuántas células tumorales pueden estar presentes, y dónde están ubicadas las células tumorales en el paciente. Véase, por ejemplo, Shao, et al. (2010) Beilstein Journal of Nanotechnology 1: 142-154.

Muestras y Obtención de muestras

Las muestras utilizadas en los métodos descritos en este documento pueden tomarse de un sujeto (paciente) que incluye, entre otros, un fluido o secreción corporal que incluye, entre otros, sangre, suero, orina, plasma, fluido prostático, fluido seminal, semen, las secreciones externas de la piel, vías respiratorias, intestinales y genitourinarias, lágrimas, líquido cefalorraquídeo, esputo, saliva, leche, líquido peritoneal, líquido pleural, líquido quístico, secreciones del sistema ductal mamario (y/o su lavado), lavado broncoalveolar, lavado del sistema reproductor y lavado de cualquier otra parte del cuerpo o sistema en el cuerpo; muestras de cualquier órgano, incluyendo célula o células o tejido o tejidos aislados, en donde la célula o el tejido se pueden obtener a partir de un órgano seleccionado de, entre

otros, tejido de pulmón, colon, ovario y/o mama; heces o una muestra de tejido, o cualquier combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el término abarca muestras de constituyentes de cultivos celular *in vivo*. Antes de someterse al ensayo de diagnóstico, la muestra puede diluirse opcionalmente con un diluyente adecuado.

5 Se pueden utilizar numerosos métodos bien conocidos de recolección de tejido o fluido para recoger la muestra biológica del sujeto con el fin de determinar el nivel de ADN, ARN y/o polipéptido del marcador de interés en el sujeto. Los ejemplos de métodos de recolección de tejidos o fluidos incluyen, entre otros, biopsia con aguja fina, biopsia con aguja, biopsia con aguja gruesa y biopsia quirúrgica (por ejemplo, biopsia cerebral) y lavado. Independientemente del procedimiento empleado, una vez que se obtiene una biopsia/muestra, se puede determinar el nivel del marcador y, por lo tanto, se puede hacer un diagnóstico.

10 Detección del epítipo NPC-1

También se describe un método para detectar los epítipos NPC-1 descritos en el presente documento en una muestra biológica, que comprende: poner en contacto una muestra biológica con un anticuerpo que reconoce específicamente un peptidomimético del epítipo NPC-1 descrito en el presente documento y detectar dicha interacción; en el que la presencia de una interacción se correlaciona con la presencia de un epítipo NPC-1 en la muestra biológica.

15 Los epítipos NPC-1 descritos en este documento son ejemplos no limitativos de marcadores para diagnosticar una enfermedad y/o un estado indicativo. Cada marcador de la presente invención se puede usar solo o en combinación, para diversos usos, incluidos, entre otros, el pronóstico, la predicción, el cribado, el diagnóstico precoz, la determinación de la progresión, la selección de la terapia y el control del tratamiento de un cáncer (por ejemplo, cáncer de páncreas, hígado, colorrectal, pulmón o mama).

20 Los cánceres que pueden detectarse utilizando los métodos descritos en este documento incluyen, entre otros, tumores no sólidos y sólidos, cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colon, útero, estómago, cuello uterino, hígado, páncreas, y en donde el cáncer puede ser invasivo o metastásico.

25 Cada epítipo NPC-1 descrito en el presente documento se puede usar solo o en combinación, para diversos usos, que incluyen, entre otros, el pronóstico, la predicción, el cribado, el diagnóstico temprano, la determinación de la progresión, la selección de la terapia y el seguimiento del tratamiento de los cánceres. tales como tumores no sólidos y sólidos, cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colon, útero, estómago, cérvix, hígado, páncreas y en el que el cáncer puede ser invasivo o metastásico. Dicha combinación puede comprender opcionalmente cualquier subcombinación de marcadores, y/o una combinación que incluya al menos otro marcador, por ejemplo un marcador conocido. Además, una combinación de este tipo puede usarse opcionalmente y preferiblemente como se describió anteriormente con respecto a la determinación de una relación entre una medición cuantitativa o semicuantitativa de cualquier marcador descrito en el presente documento con respecto a cualquier otro marcador descrito en el presente documento, y/o cualquier otro marcador conocido, y/o o cualquier otro marcador.

30 Los marcadores se pueden usar opcionalmente solos o en combinación con marcadores conocidos para el cáncer de pulmón, incluidos, entre otros, CEA, CA15-3, β -2-microglobulina, CA19-9, TPA y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante del marcador como se describe en el presente documento.

35 Los marcadores de la presente invención se pueden usar opcionalmente solos o en combinación con marcadores conocidos para el cáncer de ovario, que incluyen, entre otros, CEA, CA125 (Mucina 16), CA72-4TAG, CA-50, CA 54-61, CA-195 y CA 19-9 en combinación con CA-125, y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante del marcador como se describe en el presente documento.

40 Los marcadores pueden usarse opcionalmente solos o en combinación con marcadores conocidos para cáncer de colon, que incluyen, entre otros, CEA, CA19-9, CA50 y/o en combinación con las proteínas conocidas para la variante del marcador como se describe en el presente documento

45 Típicamente, el nivel del marcador en una muestra biológica obtenida del sujeto es diferente (es decir, mayor o menor) del nivel del mismo marcador en una muestra similar obtenida de un individuo sano (ejemplos de muestras biológicas se describen en el presente documento).

La determinación del nivel del mismo marcador en tejidos normales del mismo origen se puede realizar de manera paralela para detectar una expresión elevada y/o una amplificación y/o una expresión reducida del marcador en oposición a los tejidos normales.

50 También se describen métodos, usos, dispositivos y ensayos para el diagnóstico de cánceres tales como tumores no sólidos y sólidos, cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colon, útero, estómago, cuello uterino, hígado, páncreas, y en los que el cáncer puede ser invasivo o metastásico. Opcionalmente, se puede usar una pluralidad de marcadores. La pluralidad de marcadores puede incluir opcionalmente unos marcadores descritos en el presente documento, y/o uno o más marcadores conocidos. La pluralidad de marcadores está preferiblemente correlacionada con la enfermedad o condición. Por ejemplo, dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar la concentración de cada uno de la pluralidad de marcadores, y comparar individualmente la concentración de cada marcador con un nivel de umbral. Opcionalmente, si la concentración del marcador está por encima o por debajo del nivel de umbral

(dependiendo del marcador y/o la prueba de diagnóstico que se está realizando), la concentración del marcador se correlaciona con la enfermedad o condición. Opcionalmente y preferiblemente, una pluralidad de concentraciones de marcadores se correlaciona con la enfermedad o condición.

5 Como alternativa, dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar la concentración de cada uno de la pluralidad de marcadores, calcular un único valor de índice basado en la concentración de cada uno de la pluralidad de marcadores y comparar el valor de índice con un nivel de umbral. Además, dicha correlación puede comprender opcionalmente determinar un cambio temporal en al menos uno de los marcadores, y en el que el cambio temporal se usa en la etapa de correlación.

10 Tal correlación puede comprender opcionalmente determinar si al menos el número "X" de la pluralidad de marcadores tiene una concentración fuera de un rango predeterminado y/o por encima o por debajo de un umbral (como se describió anteriormente). El valor de "X" puede ser opcionalmente un marcador, una pluralidad de marcadores o todos los marcadores; alternativa o adicionalmente, en lugar de incluir cualquier marcador en el recuento de "X", uno o más marcadores específicos de la pluralidad de marcadores pueden ser requeridos opcionalmente para correlacionarse con la enfermedad o condición (de acuerdo con un rango y/o umbral).

15 La correlación puede comprender opcionalmente determinar si una relación de concentraciones de marcador para dos marcadores está fuera de un rango y/o por encima o por debajo de un umbral. Opcionalmente, si la relación está por encima o por debajo del nivel de umbral y/o fuera de un rango, la relación se correlaciona con la enfermedad o condición. Opcionalmente, se puede usar una combinación de dos o más de estas correlaciones con un solo panel y/o para correlacionar entre una pluralidad de paneles. Opcionalmente, el método distingue una enfermedad o
20 condición con una sensibilidad de al menos el 70% en una especificidad de al menos el 85% en comparación con los sujetos normales. Como se usa en este documento, la sensibilidad se relaciona con el número de muestras positivas (enfermas) detectadas del número total de muestras positivas presentes; la especificidad se relaciona con el número de muestras negativas verdaderas (no enfermas) detectadas del número total de muestras negativas presentes. Preferiblemente, el método distingue una enfermedad o condición con una sensibilidad de al menos el 80% con una
25 especificidad de al menos el 90% en comparación con los sujetos normales. Más preferiblemente, el método distingue una enfermedad o condición con una sensibilidad de al menos el 90% con una especificidad de al menos el 90% en comparación con los sujetos normales. También más preferiblemente, el método distingue una enfermedad o condición con una sensibilidad de al menos el 70% con una especificidad de al menos el 85% cuando se compara con sujetos que presentan síntomas que imitan síntomas de enfermedad o condición.

30 Un panel marcador se puede analizar de varias maneras bien conocidas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, cada miembro de un panel puede compararse con un valor "normal", o un valor que indica un resultado particular. Un diagnóstico/pronóstico particular puede depender de la comparación de cada marcador con este valor; alternativamente, si solo un subconjunto de marcadores está fuera de un rango normal, este subconjunto puede ser
35 indicativo de un diagnóstico/pronóstico particular. El experto en la técnica también entenderá que los marcadores de diagnóstico, los marcadores de diagnóstico diferencial, los marcadores de pronóstico, los marcadores de tiempo de aparición, los marcadores de diferenciación de la enfermedad o condición, se pueden combinar en un solo ensayo o dispositivo. Los marcadores también pueden usarse comúnmente para múltiples propósitos, por ejemplo, aplicando un umbral diferente o un factor de ponderación diferente al marcador para los diferentes propósitos.

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

Los diagnósticos anteriores también pueden incluir opcionalmente el diagnóstico diferencial de la enfermedad para distinguirla de otras enfermedades, incluidos los cánceres tales como tumores no sólidos y sólidos, cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colon, útero, estómago, cuello uterino, hígado, páncreas y en el que el cáncer puede ser
50 invasivo o metastásico que puede presentar uno o más síntomas similares o idénticos.

Uno o más indicadores de diagnóstico o pronóstico están correlacionados con una condición o enfermedad simplemente por la presencia o ausencia de los indicadores. Se pueden establecer niveles de umbral de un indicador de diagnóstico o pronóstico, y el nivel de los indicadores de una muestra de paciente puede compararse simplemente con los niveles de umbral. La sensibilidad y especificidad de una prueba diagnóstica y/o de pronóstico dependen de
55 algo más que la "calidad" analítica de la prueba; también dependen de la definición de lo que constituye un resultado anormal. En la práctica, las curvas de características operativas del receptor, o las curvas "ROC", se calculan típicamente al trazar el valor de una variable en función de su frecuencia relativa en poblaciones "normales" y "enfermas", y/o mediante la comparación de los resultados de un sujeto antes, durante y/o después del tratamiento.

Los epítomos NPC-1 pueden presentarse como un biomarcador para detectar cánceres tales como tumores no sólidos

y sólidos, cáncer de mama, próstata, pulmón, ovario, colon, útero, estómago, cuello uterino, hígado, páncreas y en los que el cáncer puede ser invasivo o metastásico.

En la presente invención se describen secuencias de aminoácidos o fragmentos de las mismas codificadas por secuencias de ácido nucleico correspondientes a epítomos NPC-1 como se describe en el presente documento.

5 Cualquier oligopéptido o péptido relacionado con dicha secuencia de aminoácidos o fragmento de la misma también puede usarse opcionalmente (adicional o alternativamente) como un biomarcador.

En el presente documento se describe un método para detectar un polinucleótido de esta invención en una muestra biológica, usando ensayos basados en NAT, que comprende: hibridar las moléculas de ácido nucleico aisladas o fragmentos de oligonucleótidos de al menos aproximadamente una longitud mínima con un material de ácido nucleico de una muestra biológica y detección de un complejo de hibridación; en el que la presencia de un complejo de hibridación se correlaciona con la presencia del polinucleótido en la muestra biológica. Los ejemplos no limitantes de métodos o ensayos se describen en el presente documento. La presente invención también se refiere a kits basados en tales métodos de diagnóstico o ensayos.

Además, los epítomos NPC-1 pueden usarse como biomarcadores específicos para el cáncer de páncreas y colon, y pueden medirse en tejido de biopsias, así como en muestras de suero y fecales de un sujeto, como se describe en el presente documento. Además, los procedimientos de diagnóstico utilizados para detectar el cáncer colorrectal incluyen, entre otros, el análisis de sangre oculta en heces (FOBT), la colonoscopia, la colonografía por tomografía computarizada (colonoscopia virtual) [detecta lesiones colorrectales de más de 6 mm de diámetro con la misma sensibilidad que la colonoscopia], Sigmoidoscopia flexible, enema de bario de doble contraste y examen rectal digital. Winawer, et al (1 97) Am J. Gastroenterology 112: 594-642; Blum (1995) Eur. J. Canc. 31: 1369-72; Ransohoff y Sandler (2002) N. Engl J. Med. 346: 346-44; Bruzzi (2002) N. Engl. J. Med. 346: 1672-74; y Laghi, et al., i2002 Am. J. Surg. 183: 124-31.

Inmunoensayos

Los peptidomiméticos de NPC-1 se pueden usar en inmunoensayos para detectar y analizar cualitativamente o cuantitativamente los marcadores en una muestra. Este método comprende proporcionar un anticuerpo que se une específicamente a un peptidomimético del epítomo NPC-1; poner en contacto una muestra con el anticuerpo; y detectar la presencia de un complejo del anticuerpo unido al marcador en la muestra.

Un epítomo NPC-1 puede detectarse y/o cuantificarse utilizando cualquiera de una serie de ensayos de unión inmunológica bien reconocidos. Los ensayos útiles incluyen, por ejemplo, un ensayo inmune enzimático (EIA) tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), un análisis de transferencia Western o un análisis de transferencia de ranura. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Nos. 4.366.241; 4.376.110; 4.517.288; y 4.837.168. En general, una muestra obtenida de un sujeto se puede poner en contacto con el anticuerpo que se une específicamente al epítomo NPC-1.

Opcionalmente, el anticuerpo se puede fijar a un soporte sólido para facilitar el lavado y posterior aislamiento del complejo, antes de poner en contacto el anticuerpo con una muestra. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen, entre otros, vidrio o plástico en forma de, por ejemplo, una placa de microtitulación, una barra, una perla o una microperla. Los anticuerpos pueden estar unidos a un soporte sólido.

Después de incubar la muestra con anticuerpos, la mezcla se lava y se puede detectar el complejo marcador-anticuerpo formado. Esto se puede lograr incubando la mezcla lavada con un reactivo de detección. Alternativamente, el marcador en la muestra puede detectarse usando un ensayo indirecto, en el que, por ejemplo, se usa un segundo anticuerpo marcado para detectar un anticuerpo específico unido a marcador, y/o en un ensayo de competencia o inhibición en el que, por ejemplo, se incuban un anticuerpo monoclonal que se une a un epítomo distinto del marcador simultáneamente con la mezcla.

A lo largo de los ensayos, pueden requerirse etapas de incubación y/o lavado después de cada combinación de reactivos. Las etapas de incubación pueden variar desde aproximadamente 5 segundos hasta varias horas, preferiblemente desde aproximadamente 5 minutos hasta aproximadamente 24 horas. Sin embargo, el tiempo de incubación dependerá del formato del ensayo, el marcador, el volumen de la solución y las concentraciones. Por lo general, los ensayos se llevarán a cabo a temperatura ambiente, aunque pueden realizarse en un rango de temperaturas (por ejemplo, aproximadamente 10°C a 40°C).

El inmunoensayo se puede usar para determinar la cantidad de prueba de un marcador en una muestra de un sujeto. Primero, se puede detectar una cantidad de prueba de un marcador en una muestra usando los métodos de inmunoensayo descritos anteriormente. Si hay un marcador presente en la muestra, formará un complejo marcador-anticuerpo con un anticuerpo que se une específicamente al marcador en las condiciones de incubación adecuadas descritas anteriormente. La cantidad de un complejo anticuerpo-marcador puede determinarse opcionalmente comparando con un estándar. Como se indicó anteriormente, la cantidad de prueba del marcador no necesita medirse en unidades absolutas, siempre que la unidad de medida pueda compararse con una cantidad y/o señal de control. Se conocen varios inmunoensayos en la técnica y el epítomo NPC-1, y los anticuerpos específicos para dichos antígenos descritos en el presente documento se pueden usar en dichos inmunoensayos que incluyen, entre otros,

radioinmunoensayos (RIA), ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo magnético, inmunotransferencia, transferencia Western, ensayos de inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico y clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS). Véase Wild, (2008) [Ed.] The Immunoassay Handbook [3a Ed.] Elsevier.

5 Métodos de radioimagenología

Los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 y los anticuerpos que se unen selectivamente a los peptidomiméticos del epítipo NPC-1 se pueden usar en métodos de radioimagenología para diagnosticar el cáncer, incluido cáncer pancreático y colorrectal, o monitorizar la progresión de los tumores. Estos métodos incluyen, entre otros, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de fotones individuales (SPECT). Ambas técnicas son no invasivas y se pueden usar para detectar y/o medir una gran variedad de eventos y/o funciones tisulares, como la detección de células cancerosas, por ejemplo. SPECT se puede usar opcionalmente con dos etiquetas simultáneamente. Véase la patente de Estados Unidos No. 6.696.686.

Aplicaciones y métodos comerciales

También se describen métodos para la producción del epítipo NPC-1, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 para alcanzar cantidades comerciales. El epítipo NPC-1, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 pueden producirse a gran escala, almacenarse si es necesario y suministrarse a hospitales, médicos u otras instalaciones de atención médica.

Los métodos de producción, almacenamiento y distribución del epítipo NPC-1, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 pueden producirse mediante los métodos descritos en el presente documento. Después de la producción, el epítipo NPC-1, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 pueden recogerse, purificarse y, opcionalmente, almacenarse antes del tratamiento de un paciente. Por ejemplo, una vez que un paciente presenta una indicación tal como, por ejemplo, cáncer pancreático, colorrectal, esofágico, oral o de mama, pueden ordenarse el epítipo NPC-1, los anticuerpos y sus fragmentos de unión a antígeno que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 y proporcionarse de manera oportuna. Por consiguiente, la presente invención se refiere a métodos para producir epítipo NPC-1 para obtener anticuerpos a escala comercial, composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1, así como métodos para proporcionar (es decir, producir, opcionalmente almacenar y vender) anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 para hospitales y médicos. La producción de epítipo NPC-1, anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de los mismos que se unen selectivamente al epítipo NPC-1 puede escalarse para uso comercial.

También se describen métodos para llevar a cabo un negocio farmacéutico que comprende establecer un sistema de distribución para distribuir la preparación para la venta o puede incluir establecer un grupo de ventas para comercializar la preparación farmacéutica.

Todas las publicaciones (por ejemplo, literatura que no es de patente), patentes, publicaciones de solicitud de patente y solicitudes de patente mencionadas en esta memoria descriptiva son indicativas del nivel de habilidad de los expertos en la técnica a los que pertenece esta invención.

Ejemplos

40 Ejemplo 1

Identificación del epítipo NPC-1

Se generó un anticuerpo NEO-100 en ratones inmunizados con la denominada "vacuna contra el cáncer de colon de Hollinshead". Hollinshead, et al., (1985) Cancer 56: 480-489. Un anticuerpo NEO-100 y la forma quimérica, NEO-101, se describen en las patentes de Estados Unidos Nos 7.314.622 y 7.763.720. Se prepararon varias purificaciones de proteínas utilizando tanto NPC-1 de ratón como anticuerpos NEO-101 quiméricos recombinantes.

Las líneas celulares tumorales que incluyen LS 174T y HT-29 (tumor colorrectal humano), CFPAC-1 (tumor pancreático humano), espécimen de tumor de cáncer de colon y las vacunas contra el cáncer de colon de Hollinshead sirvieron como fuentes de antígeno tumoral para extractos de proteína. El epítipo NPC-1 se secreta en el medio de las líneas celulares tumorales humanas, y el antígeno se purificó a partir del sobrenadante de células tumorales de células cultivadas en ausencia de suero durante 5 a 7 días. El anticuerpo NEO-101 se acopló a resinas para la purificación del antígeno, incluidas las perlas magnéticas, para una simple adsorción, lavado y elución de las perlas. La proteína que se eluyó de las perlas de anticuerpo NEO-100 se estudió más a fondo para determinar la presencia, caracterización e identificación del antígeno.

Transferencia Western de extractos de células tumorales humanas y sobrenadantes usando el anticuerpo NEO-101. Las proteínas de los sobrenadantes de células AsPC-1, LS174T o CFPAC-1 o los extractos de detergente de

sedimentos celulares se procesaron en SDS-PAGE, se transfirieron a la membrana de PVDF y luego se tiñeron con el anticuerpo NEO-101. Una especie de masa molecular alta con reactividad cruzada con un anticuerpo NEO-100 estimado en 1.000-2.000 kDa fue identificada por SDS-PAGE. Una inmunotransferencia proteica del antígeno tumoral de las células que utilizan el anticuerpo NEO-101, incluido el sedimento de células AsPC-1, el sobrenadante de AsPC-1, el sedimento de células LS 174T, el sobrenadante de LS 174T, el sedimento de células CFPAC-1 y el sobrenadante de CFPAC-1 junto con marcadores de peso molecular .

La proteína inmunopurificada procedente de células tumorales LS 174T se sometió a escisión proteolítica mediante tripsina o proteasa V8, seguido de un análisis de transferencia Western de los fragmentos de proteína. Un antígeno inmunopurificado de 1.000 a 2.000 kDa se digirió en cuatro fragmentos discretos que oscilan en masa desde aproximadamente 60 kDa hasta 220 kDa, cada uno de los cuales contiene un epítipo peptídico inmunorreactivo NPC-1. Se realizó una inmunotransferencia proteica del antígeno tumoral digerido proteolítico de las células que utilizan el anticuerpo NEO-101 con el sedimento de células LS 174T, sobrenadante LS 174T, antígeno inmunopurificado digerido con tripsina, antígeno inmunopurificado digerido con proteasa V8 junto con un marcador de peso molecular. Los datos sugirieron que hay múltiples regiones de unión al anticuerpo NEO-101 presentes en cada molécula del antígeno tumoral.

El epítipo NPC-1 se preparó para su identificación por espectrometría de masas mediante la preparación de antígenos inmunopurificados a partir de varias fuentes tumorales diferentes en SDS-PAGE, cortando la banda inmunoreactiva NPC-1 de alta masa molecular del gel de poliacrilamida y sometiendo la proteína a digestión con tripsina seguida de LC/MS/MS en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL. Los datos de iones de productos peptídicos de tripsina definidos por masa y carga se buscaron en la base de datos humana IPI directa e inversa concatenada utilizando el motor de búsqueda Mascot. La base de datos se adjuntó con proteínas de fondo comúnmente observadas para prevenir las asignaciones falsas de péptidos derivados de esas proteínas. Los archivos de salida Mascot se analizaron en el programa Scaffold para filtrar y evaluar las tasas de descubrimiento falso y permitir solo las identificaciones correctas de proteínas. Las muestras derivadas de ratas, ratones y humanos se buscan en la base de datos del International Protein Index (IPI). Las fuentes de antígeno para estos experimentos se derivaron de líneas celulares tumorales colorrectales humanas (LS174T, HT-29) y pancreáticas (CFPAC-1). Los resultados de seis experimentos de espectrometría de masas sugirieron la presencia de péptidos derivados de MUC5AC en la preparación de inmunopurificación de NPC-1.

La secuencia de aminoácidos de MUC5AC como se informa en la base de datos IPI (IPI00103397). La secuencia consiste en 5.030 aminoácidos con una masa pronosticada de 526.585 Da (sin modificaciones postraduccionales, incluida la glicosilación). La comparación de la cobertura de péptidos de los experimentos de espectrometría de masas con la secuencia de aminoácidos de MUC5AC (SEQ ID NO: 36) y otros mapas de cobertura de péptidos, revela que la mayoría de los péptidos secuenciados después de la digestión con tripsina se derivan del extremo terminal N o de tercer extremo terminal C de la molécula. En cada experimento, hubo muy pocos péptidos que se derivaron del tercio central de la molécula MUC5AC, que contiene "repeticiones en tándem" de 8 residuos de aminoácidos que incluyen, por ejemplo, TTSTTSAP (SEQ ID NO: 42), GSTPSPVP (SEQ ID NO : 43), y TASTTSGP (SEQ ID NO: 44). Silverman, et al, (2001) Glycobiology 11: 459-71. Esta región de MUC5AC está altamente glicosilada en tejidos normales que expresan MUC5AC, tal como el endotelio pulmonar y de colon. Es probable que la falta de cobertura de la secuencia peptídica en la región central de MUC5AC, tal como se detecta por espectrometría de masas, se deba a un alto grado de glicosilación en la región, que interfiere con la digestión con tripsina. Estos resultados sugieren que la región de repetición en tándem de MUC5AC comprende al menos un epítipo NPC-1.

Ejemplo 2

Inactivación del epítipo NPC-1

Se usó una pequeña secuencia objetivo de ARN inhibidor (ARNpi) diseñada contra una región de MUC5AC en células que se sabe que expresan el epítipo NPC-1. Se diseñaron varios oligonucleótidos de ARNpi con base en secuencias MUC5AC. Las secuencias de los oligonucleótidos de ARNpi de MUC5AC humanos se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos de ARNpi de MUCSAC

Oligonucleótido	Cadena	Secuencia
ARNpi ID # s9074	Sentido	AGAUGUGCCUCAACUACGAtt (SEQ ID NO: 51)
	Antisentido	UCGUAGUUGAGGCACAUCUtg (SEQ ID NO: 52)
ARNpi ID # s9075	Sentido	GCUCUGGAACGUGAGCAUAtt (SEQ ID NO: 53)
	Antisentido	UAUGCUCACGUUCCAGAGCcg (SEQ ID NO: 54)
ARNpi ID # s9076	Sentido	GCGUGCUCGUCGACAACUAtt (SEQ ID NO: 55)

Oligonucleótido	Cadena	Secuencia
	Antisentido	UAGUUGUCGACGAGCACGCgg (SEQ ID NO: 56)

Los ARNpi se transfectaron en células tumorales LSI 74 y CFPAC-1, así como en células A549. A549 es una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano que expresa MUC5AC (como se muestra por PCR y detección utilizando anticuerpos comercialmente disponibles contra MUC5AC), pero no el epítipo NPC-1. La especie MUC5AC expresada por las células A549 no es inmunorreactiva con el anticuerpo NEO-101, una característica que demuestra la especificidad tumoral del epítipo NPC-1 en contraste con los anticuerpos disponibles comercialmente contra MUC5AC. Las células A549 sirven como control para mostrar la especificidad de unión al tumor de páncreas/colon del anticuerpo NEO-101. Después de la transfección del ARNpi en células tumorales, el MUC5AC expresado por las células se midió mediante una PCR específica para medir los niveles de ARNm de MUC5AC y un ELISA tipo sándwich que usa el anticuerpo NEO-101 para medir los niveles de MUC5AC. Los datos mostrados en la Tabla 6 demuestran que un cóctel de tres oligonucleótidos de ARNpi dio como resultado disminuciones significativas tanto del ARNm de MUC5AC como de la proteína MUC5AC reactiva a NEO-101 (por ejemplo, epítipo NPC-1).

Tabla 6: Inactivación de ARNpi de MUCSAC en Células tumorales pancreática (CFPAC-1) y colorrectal (LS174T) humanas

		ARNm de MUC5AC normalizado*	Proteína MUC5AC normalizada**
CFPAC-1 no tratadas		1	1
CFPAC-1 tratadas con cóctel ARNpi	20 pmol	0,2737	0,6967
	50 pmol	0,3057	0,6901
	200 pmol	0,1368	0,3566
LS174T no tratadas		1	1
LS174T tratadas con cóctel ARNpi	20 pmol	0,6917	0,53
	50 pmol	0,3858	0,402
	200 pmol	0,235	0,117

* El nivel de ARNm de MUC5AC se midió mediante RT-PCR, normalizado como un porcentaje de los niveles de ARNm detectados en células no tratadas.

** El nivel de proteína MUC5AC secretado en sobrenadantes celulares se midió mediante ELISA tipo sándwich [NEO-101 para capturar y detectar el anticuerpo 1-13M anti-MUC5AC (Abeam catálogo # ab24070)], normalizado como un porcentaje detectado en células no tratadas.

La cantidad de expresión disminuida de MUC5AC dependió de la dosis del cóctel de ARNpi transfectado en las células. Aproximadamente el 70% -90% de la expresión de MUC5AC (ARNm y proteína) se inhibió tanto en las líneas celulares LS174T como en CFPAC-1 con 200 pmoles del cóctel de ARNpi. Estos resultados confirmaron que MUC5AC es el objetivo del anticuerpo NEO-101. Las células A549 utilizadas como control en estos experimentos mostraron una disminución en la expresión de MUC5AC mediante el análisis de ARNm, pero no hubo cambios en el ELISA tipo sándwich de NEO-101 porque el MUC5AC expresado por estas células no es reconocido por un anticuerpo NEO-100. Por lo tanto, los datos de ARNpi demuestran que la reducción de la expresión de MUC5AC conduce a una disminución actual en la unión del anticuerpo NEO-101.

Ejemplo 3

Mapeo del epítipo NPC-1

Los datos por transferencias Western de MUC5AC digerida con tripsina indicaron que puede haber varios sitios de unión al anticuerpo NEO-101 en cada molécula de MUC5AC, lo que sugiere que puede estar presente una región de unión en cada una de las unidades de repetición en tándem ubicadas en la región central de la molécula. Un ejemplo de secuencia de aminoácidos de MUC5AC se presenta en la SEQ ID NO: 36 con un ejemplo de secuencia de ácido nucleico que codifica MUC5AC presentada en la SEQ ID NO: 37. Por lo tanto, se diseñó y construyó un plásmido de expresión recombinante que codifica los residuos secuencia arriba de las unidades de repetición en tándem y dos unidades de repetición en tándem ("MUC5AC largo" SEQ ID NO: 38 con la correspondiente secuencia de ácidos

nucleicos de la SEQ ID NO: 39). El péptido MUC5AC largo corresponde a los residuos 2636 a 2942 de aminoácidos de la proteína MUC5AC (SEQ ID NO: 36). Se diseñó y construyó un segundo plásmido de expresión que codificó principalmente un dominio corto que se conecta a la región central repetitiva y solo una parte de los residuos de repetición en tándem ("MUC5AC corto" SEQ ID NO: 40 con el ácido nucleico que lo codifica en la SEQ ID NO: 41). El péptido corto MUC5AC corresponde a los residuos de aminoácidos 2636 a 2763 de la proteína MUC5AC (SEQ ID NO: 36). Se predijo que estos fragmentos más pequeños de la molécula de MUC5AC grande comprenden las regiones de unión al anticuerpo NEO-101 que contienen el epítipo o epítipos de NPC-1.

Las secuencias de ADN que contienen las regiones de unión al anticuerpo NEO-101, con base en la secuencia de aminoácidos, se volvieron a traducir en la secuencia de ácido nucleico y los ADN se sintetizaron mediante métodos bien conocidos en la técnica. Estos fragmentos de ADN se clonaron en un plásmido de expresión de mamífero mediante técnicas estándar y se transfectaron varios clones independientes en células de ovario de hámster a chino (CHO) que se mostró anteriormente que no expresaban el epítipo NPC-1. El análisis de las células CHO después de la transfección demostró inmunorreactividad con un anticuerpo NEO-100 en varios de los clones de plásmidos. Se realizaron experimentos para probar la unión por inmunofluorescencia y transferencia de inmunoproteínas de extractos de células transfectadas.

Los datos de cuantificación de inmunofluorescencia mostraron que el anticuerpo NEO-101 se unió al 11%-80% de las células CHO transfectadas con diferentes clones de plásmidos del constructo corto MUC5AC, y al 76%-88 de células CHO transfectadas con diferentes clones de plásmidos del constructo largo MUC5AC. Se realizó un análisis de transferencia Western utilizando NEO-101 para sondear extractos de células CHO después de la transfección con los clones de plásmidos cortos MUC5AC y largos MUC5AC. La región de unión al anticuerpo NEO-101 se expresó mediante estos dos péptidos relacionados con MUC5AC como se confirmó mediante el análisis de transferencia Western. La masa molecular de las bandas de proteínas inmunorreactivas representa la masa predicha del fragmento de proteínas, incluida la glicosilación que se produce en las células CHO de mamífero. Los datos confirman además que el antígeno NPC-1 (por ejemplo, una región de unión al anticuerpo NEO-100) está contenido en los fragmentos relacionados con MUC5AC aislados y expresados en las células transfectadas.

Los resultados de estos experimentos muestran que al menos un epítipo NPC-1 está contenido tanto en el fragmento de 307 aminoácidos del péptido largo MUC5AC como en el fragmento de 128 aminoácidos del péptido corto MUC5AC. Estos resultados también sugieren que el epítipo NPC-1 puede ser un epítipo conformacional en lugar de un epítipo lineal.

Ejemplo 4

Eliminación de constructos para el mapeo detallado del epítipo del antígeno largo MUC5AC

Se mostró que la región de unión a NEO-101 que se expresaba por MUC5AC, truncamientos sucesivos que comienzan en el extremo terminal N o en el extremo terminal C del constructo puede ser generada mediante técnicas estándar de biología molecular para identificar una región que está involucrada en la unión del anticuerpo NEO-101 a MUC5AC. Se realizaron seis constructos de truncamiento que representan truncamientos en el extremo terminal C de la proteína MUC5AC de longitud completa (SEQ ID NO: 36).

Tabla 7: Constructos de truncamiento de MUC5AC

Constructo	Modificación	SEQ ID NO	¿Se une a NPC-1?
1-338	Truncamiento del extremo terminal C	50	Sí
1-289	Truncamiento del extremo terminal C	49	Sí
1-187	Truncamiento del extremo terminal C	48	Sí
1-151	Truncamiento del extremo terminal C	47	Sí
1-136	Truncamiento del extremo terminal C	46	No
1-85	Truncamiento del extremo terminal C	45	No

Las células 293T se cultivaron en cubreobjetos recubiertos con FBS durante 24 horas. Las células se transfectaron de forma transitoria con 2 µg de constructos MUC5AC de la Tabla 8 con LIPOFECTAMINE®. Las células se cultivaron durante aproximadamente 72 horas, se fijaron con PFA aproximadamente al 4% en PBS, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton X-20 aproximadamente al 0,2% en PBS y se lavaron con PBS. Luego, las células se bloquearon con BSA aproximadamente al 1% en PBS, y se agregaron aproximadamente 2 µg/mL de anticuerpo NEO-101 a los pozos de muestra y aproximadamente 2 µg/mL de un control de isotipo se agregaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las células se lavaron con PBS y se añadió el segundo anticuerpo anti-FITC humano (1: 500)

a todos los pozos y a los pozos de control del segundo anticuerpo. Las células se lavaron y se montaron en portaobjetos con montaje duro DAPI. Se dejaron reposar los cubreobjetos durante la noche a aproximadamente 4°C. Los portaobjetos se visualizaron con un microscopio Nikon Eclipse Ti con una cámara Andor. Se contaron al menos 3 campos aleatorios por transfección.

5 Esta estrategia se usó para identificar una región de aproximadamente 15 aminoácidos que contiene un epítipo NPC-1: GCPVTSTPVTAPSTP (SEQ ID NO: 35). Los constructos MUC5AC con 338, 289, 187 y 151 residuos de aminoácidos tenían todos actividad de unión con el anticuerpo NEO-101. Véase la TABLA 2B. Las supresiones 151 y 85 no mostraron unión. El segundo anticuerpo y los controles de IgG también fueron negativos para la unión a las líneas celulares 293T transfectadas con el constructo del residuo 338 de MUC5AC (SEQ ID NO: 50). Estos datos sugieren que la secuencia GCPVTSTPVTAPSTP (SEQ ID NO: 35) está involucrada en la unión del anticuerpo NPC-101 a MUC5AC. Esta es una secuencia repetitiva que también tiene algunos cambios en ella que también son andamiajes probables para los sitios de unión para el anticuerpo NEO-101. Esta secuencia repetitiva y variaciones se pueden encontrar en las eliminaciones más largas de MUC5AC y el mismo MUC5AC.

Ejemplo 5

15 El epítipo NPC-1 es un biomarcador específico para cáncer pancreático y colorrectal

El anticuerpo NEO-101 es específico para el antígeno relacionado con MUC5AC expresado a partir de líneas celulares de cáncer de colon (LS174T) y páncreas (CFPAC-1) humanas. El antígeno relacionado con MUC5AC expresado por estas dos líneas celulares de cáncer comprendía el epítipo NPC-1 y competía eficazmente con el antígeno MUC5AC nativo previamente recubierto en placas de ELISA para unirse al NEO-101 en el ensayo. Como control, MUC5AC no portador de NPC-1 expresado por células de adenocarcinoma de pulmón A549 no compitió con la unión del anticuerpo NEO-101 a MUC5AC nativo recubierto con las placas de ELISA.

Las células LS174T y CFPAC-1 se cultivaron en cubreobjetos recubiertos en FBS durante 48 horas. Las células se fijaron luego con PFA al 4% en PBS, se lavaron con PBS, se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2%, se lavaron con PBS y se bloquearon con BSA al 1% en PBS. Las células se incubaron con 2 µg/mL de NEO-101, MS-X, 2-HMI, H160, 351-450, 2-12M1 o 1-13M1. Las células se lavaron con PBS y luego se añadió el segundo anticuerpo anti-FITC humano, anti-FITC de ratón o anti-FITC de conejo (1:500), las células se lavaron y se montaron en portaobjetos con montaje duro DAPI. Se dejaron reposar los cubreobjetos durante la noche a 4°C. Los portaobjetos se visualizaron con un microscopio Nikon Eclipse Ti con una cámara Andor.

30 Todos los anticuerpos tiñeron las células LS174T. Los patrones de tinción y la localización parecían iguales para todos los anticuerpos analizados. Hubo diferencias en la tinción celular en las células CFPAC-1 en comparación con las células LS174T. NEO-101 tiñó alrededor del 50% de las células. MS-X y 2-11M1 tiñeron menos del 5% de las células. 351-450 y 2-2M1 no tenían ninguna tinción con las células CFPAC-1. H160 y 1-13M1 tiñeron el 100% de las células CFPAC-1.

Estos datos sugieren que todos los anticuerpos pueden detectar la proteína MUC5AC colorrectal con la misma eficacia, pero en las células de cáncer de páncreas hay variaciones en los patrones de tinción entre los diferentes anticuerpos MUC5AC. Esto sugiere que NEO-101 puede detectar ambos tipos de MUC5AC y que otros anticuerpos comerciales no reconocen el mismo epítipo.

Un ensayo ELISA homólogo (adaptado de un kit ELISA ImmunoBooster®, Bioworld Consulting de Laboratories, LLC, Mt. Airy, MD) se diseñó utilizando el anticuerpo NEO-101 como reactivo de captura y detección (por ejemplo, se desarrolló un ELISA tipo sándwich utilizando el anticuerpo NEO-101 como reactivo de captura utilizando un NEO-101 marcado con biotina utilizado como el anticuerpo de detección). Este formato de anticuerpo homólogos fue posible debido al descubrimiento de múltiples sitios de unión al antígeno NPC-1 expresados por el antígeno relacionado con MUC5AC asociado al cáncer. Se obtuvieron muestras de suero de diversas fuentes comerciales y privadas. El ensayo desarrollado en este documento utilizó suero de pacientes con cáncer colorrectal y pancreático, y suero de donantes de sangre sanos.

Las placas de microtitulación (Nunc Maxisorp de 96 pozos) se recubrieron con anticuerpo NEO-101 no marcado purificado a aproximadamente 10 µg/mL en carbonato de sodio 0,5 M, pH 9,5, durante la noche a aproximadamente 25°C. Las placas luego se bloquearon con leche descremada al 1% elaborada en solución salina regulada con Tris (TBS) que contenía EDTA 5 mM y sacarosa al 1% durante aproximadamente 4 horas a aproximadamente 2°C. Las placas preparadas de esta manera se pueden almacenar secas y selladas durante al menos aproximadamente 8 meses. Todas las diluciones se realizaron en reguladores ImmunoBooster® (Bioworld Consulting Laboratories, LLC) complementados con EDTA 20 mM. El regulador de lavado era TBS que contenía detergente no iónico Tween®-20 al 0,05%. Se usó un extracto detergente de células tumorales colorrectales humanas LS174T como fuente de antígeno NPC-1 para derivar una curva estándar. Los extractos derivados de células tumorales CFPAC-1 pancreáticas humanas o células tumorales A549 de pulmón humano se generaron de manera similar. Las líneas celulares tumorales se adquirieron a través de la American Type Culture Collection (Manassas, VA) y se cultivaron en medio RPMI que contenía FBS al 10% (inactivado por calor) con glutamina 8 mM. Para medir la unión directa de NEO-101 al antígeno relacionado con MUC5AC, las células CFPAC-1 se cultivaron en medio sin suero durante aproximadamente 5 días y

el medio acondicionado se filtró y se almacenó en un lote grande a aproximadamente 4°C.

Los ELISA tipo sándwich se realizaron diluyendo el estándar de extracto celular en cada placa, junto al paciente o muestras de suero normales diluidas 1:24 en el diluyente. Todas las incubaciones se realizaron a aproximadamente 25°C y todos los volúmenes fueron de aproximadamente 100 µL por pozo. Las placas se incubaron durante 15 minutos y se lavaron tres veces con regulador de lavado. NEO-101 marcado con biotina se añadió luego a los pozos a razón de 1 g/mL, se incubó durante aproximadamente 15 minutos y las placas se lavaron tres veces. Se añadió estreptavidina conjugada con peroxidasa (dilución 1:5.000) a las placas durante aproximadamente 15 minutos, y las placas se lavaron tres veces con regulador de lavado y dos veces con TBS. El ensayo se desarrolló mediante la adición de sustrato TMB (BioFX Laboratories Inc.) a las placas, se incubó durante aproximadamente 15 minutos, luego se detuvo la reacción de color con la adición de ácido sulfúrico 0,5 M. Los datos se adquirieron midiendo la absorbancia a 450 nm. Los datos recopilados se procesaron utilizando los paquetes de software GraphPad Prism o Microsoft Excel.

Este ELISA se usó para evaluar el suero de pacientes con cáncer colorrectal y pancreático (n = 42), suero de donantes de sangre sanos (n = 75) y suero de estados patológicos potencialmente interferentes, tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, síndrome de intestino irritable y enfermedad de Crohn (n = 56). El análisis de estas diversas muestras de suero demuestra el uso del ensayo biomarcador de antígenos NPC-1 para detectar el epítipo NPC-1 (por ejemplo, MUC5AC aberrante) vertido en la sangre de pacientes con cáncer colorrectal. Una prueba ELISA NPC-1 puede detectar MUC5AC aberrante en pacientes con cáncer de colon. C1 y C2 son muestras de suero normales de donantes de sangre sanos. La combinación AB es el suero combinado de muchos donantes de sangre sanos. Todas las demás muestras numeradas del número 1 al número 17 son de suero recolectado de pacientes con cáncer de colon. El uso del anticuerpo NEO-101 como anticuerpo de recubrimiento (anticuerpo de captura) y NEO-101 marcado con biotina como anticuerpo de detección es altamente específico, y puede explicarse por la presencia de múltiples regiones de unión (es decir, epítopos) sobre la misma molécula de antígeno, de modo que se obvia el impedimento estérico.

Se pidió a los pacientes con cáncer colorrectal o páncreas que participaran en un estudio. Las muestras de suero se recibieron y almacenaron a aproximadamente -35°C hasta el momento de la prueba. Se recibieron portaobjetos de biopsia tumoral a temperatura ambiente y se analizaron posteriormente mediante IHC utilizando anticuerpos marcados con biotina. También se proporcionó información del paciente, que contenía datos clínicos limitados para la muestra del paciente (etapa de la enfermedad, medicamentos actuales). Para cada paciente inscrito, se proporcionaron 1, 2 o 3 muestras de suero para cada paciente separado por aproximadamente 1 mes. Se incluyó un grupo de muestras de suero "sanas normales" para comparación. Estas se adquirieron a través de un banco de sangre metropolitano y comprendían un grupo de hombres y mujeres normales, autoproclamados, de raza mixta, de edades comprendidas entre los 40 y los 59 años. Se desconoce el estado de salud real de estos donantes, por lo que la comparación de cualquier muestra con este grupo de donantes normales puede realizarse con la debida precaución.

El ELISA en suero con NEO-101 se realizó usando un antígeno estándar preparado a partir de un extracto de línea celular cultivada a partir de células tumorales que se sabe que expresan el antígeno NPC-1. Se sometieron a prueba los triplicados de una dilución 1/24 de muestras de suero de grupos de donantes "sanos normales" y pacientes con cáncer de colon y páncreas diagnosticados clínicamente, y los datos sin procesar se interpolaron de la curva estándar. La expresión del antígeno NPC-1 se determinó en relación con esta preparación de antígeno estándar (equivalentes de células LS 174T/pozo).

Los resultados mostraron que los estados de enfermedad interferentes, que se espera que típicamente tengan un MUC5AC sérico elevado, no expresaron niveles más altos de epítipo NPC-1 en comparación con los controles. Además, la comparación de los niveles en suero de MUC5AC de pacientes con cáncer colorrectal y pancreático con suero de controles sanos demostró la capacidad del ensayo para diferenciar a los pacientes con cáncer de los donantes normales con una diferencia de aproximadamente 0,7 unidades logarítmicas. Además, el ELISA de NEO-101 diferenciaba con precisión a los pacientes con enfermedad activa o metastásica de los pacientes que no tenían evidencia de enfermedad. Notablemente, en una comparación lado a lado del ELISA de NEO-101 con un ELISA comercial para CA1 -9, el ELISA de NEO-101 resultó ser superior.

Los pacientes inscritos en el estudio de diagnóstico clínico acordaron proporcionar su biopsia de tumor o muestra quirúrgica para ser teñida inmunohistoquímicamente con NEO-101. Las secciones del tumor se prepararon como portaobjetos, y se prepararon dos portaobjetos adicionales para el control negativo (IgG1 humana) y la tinción del control positivo (citoqueratina) para garantizar controles de calidad para el método IHC. Más específicamente, las muestras de biopsias de tumores de pacientes con cáncer colorrectal y de páncreas se desparafinaron a aproximadamente 60°C durante 30 minutos antes de la tinción con NEO-101. Posteriormente, todas las etapas de tinción se llevaron a cabo a aproximadamente 25°C. Los portaobjetos (4 µm) se bloquearon con el inhibidor de Peroxo-Bloc® (Zymed Laboratories) durante aproximadamente 2 minutos, se enjuagaron con solución salina regulada con fosfato (PBS) y se bloquearon con CAS (Zymed) durante unos 10 minutos adicionales. Los portaobjetos se tiñeron con aproximadamente 10 µg/mL de NEO-101 marcado con biotina durante 1 hora, y se lavaron tres veces con PBS que contenía un 0,05% de detergente no iónico Tween®-20. La titulación previa de NEO-101 biotinilado demostró que aproximadamente 10 g/mL es una concentración óptima para la detección inmunohistoquímica del antígeno NPC-1. Luego se aplicó una dilución 1:400 de estreptavidina conjugada con peroxidasa (Dako North America, Inc.) a los portaobjetos durante aproximadamente 30 minutos y los portaobjetos se lavaron tres veces. Se aplicó una solución de

DAB (Zymed) durante aproximadamente 2-3 minutos y luego se enjuagó con PBS. Luego se aplicó una solución de hematoxilina durante aproximadamente 3 minutos y se enjuagó con agua del grifo hasta que se aclaró. Los portaobjetos se deshidrataron con xileno y se agregó un cubreobjetos usando el medio de montaje PermOUNT®. Portaobjetos consecutivos adicionales se tiñeron con citoqueratina humana AE1/AE3 (Abeam pic) como control positivo e isotipo de IgG1 humana como control negativo (AXXORA, LLC).

Todos los anticuerpos se biotinizaron antes de su uso y se probaron de forma independiente a diversas concentraciones utilizando tejidos de tumores humanos que se sabe que reaccionan con los anticuerpos. El anticuerpo primario (NEO-101) se usó a aproximadamente 10 µg/mL, se detectó con conjugado de estreptavidina - peroxidasa de rábano picante y se montó en portaobjetos. Se aplicó una escala de tinción positiva de +1 a +5 a los resultados de la tinción, medida mediante microscopía óptica. Los tejidos teñidos con NEO-101 se consideraron positivos (+1 a +5) para un promedio del 79% de las muestras de tumores del paciente (30 de 38 de las biopsias de cáncer colorrectal y pancreático), incluidas las 5 muestras de tumores pancreáticos. Los tejidos que fueron negativos o que se consideraron débilmente teñidos por parte del inmunohistoquímico se consideraron negativos. Estos resultados de tinción son similares a los resultados de varios otros estudios completados con anticuerpos que utilizan portaobjetos de tejido, y muestras quirúrgicas congeladas y embebidas en parafina. Los resultados de la tinción IHC se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Resultados de la tinción IHC

Tipo de cáncer	Número de sujetos	% Positivo por IHC con NEO-101
Colorrectal	33	76% (25/33)
Pancreático	5	100% (5/5)

Notas: (1) la mayoría de las muestras de biopsia de tejido se recolectaron cuando los pacientes se clasificaron con cáncer de estadio 2 a 4, (2) se incluyeron portaobjetos de tejido con control positivo y negativo y se demostró que se tiñen negativamente solo con el anticuerpo secundario (negativo) o con anticuerpo anti-citoqueratina (positivo).

Los resultados de la tinción IHC utilizando el anticuerpo NEO-101 se compararon luego con los resultados para cada ELISA de suero para cada sujeto en el que ambos conjuntos de resultados (sueros y biopsia) estaban disponibles. Para simplificar, se utilizó el promedio del ELISA sérico de cada extracción de sangre para esta comparación. Los resultados de este análisis demostraron que el 84% (32/38) de las muestras de suero fueron positivas usando un corte de 335 unidades/mL y el 79% (30/38) de las muestras de tejido fueron positivas, lo que proporcionó una alta concordancia de las dos ensayos utilizando NEO-101.

Se adquirió un mayor número de muestras de suero para probar la utilidad del ELISA con base en suero en la detección del antígeno NPC-1. Una muestra de 41 sueros de pacientes con cáncer colorrectal o páncreas se comparó con los sueros obtenidos de 28 donantes de sangre sanos normales. En esta población de pacientes con cáncer, la sangre se recolectó en forma serial durante un período de aproximadamente 3 meses para varios de los pacientes mientras se sometían a diversos regímenes de tratamiento con un médico oncólogo. Por múltiples razones, no se extrajo sangre de todos los pacientes en los tres puntos de tiempo. Por lo tanto, hubo 41 pacientes que donaron sangre en su primera evaluación por parte del médico oncólogo, seguidos por 33 pacientes que donaron su sangre en la segunda visita y 25 pacientes que completaron las tres donaciones de sangre en la tercera visita. La mayoría de los pacientes fueron diagnosticados con enfermedad en estadio III o IV.

La Figura 2A muestra los resultados de la prueba de este panel más grande de muestras de suero de pacientes con cáncer colorrectal y pancreático, en comparación con un grupo de donantes de sangre sanos normales. El análisis de los resultados demostró aproximadamente una diferencia logarítmica de 0,7 entre los pacientes con cáncer y los donantes sanos en cada una de las tres extracciones de sangre. La media y el error estándar de la media para cada grupo de control para los ensayos son: normales (355 ± 60), cáncer de colon/páncreas, 1 mes (1.757 ± 580), cáncer de colon/páncreas 2 meses (1.894 ± 671), cáncer de colon/páncreas, 3 meses (1.293 ± 390). Usando el método de la prueba t no pareada (de 2 colas) para evaluar la diferencia entre el grupo de sueros normales y los grupos de sueros de cáncer, las diferencias para cada comparación fueron: Normal frente a 1 mes [$p = 0.0511$]; normal frente a 2 meses [$p = 0,0397$]; Normal frente a 3 meses [$p = 0,0153$]. Además, utilizando un valor de corte de 355 células/pozo derivado del promedio de sueros normales, el 73% de los sueros con cáncer de colon/páncreas, 1 mes estaban por encima del corte (30 de 41 muestras), y el 88% estaban por encima del corte en cada uno de los 2 meses (29 de 33 muestras) y 3 meses (22 de 25 muestras) en esos grupos. En general, las muestras representan un promedio de 82% de positivos por encima del límite establecido para el ensayo. Estos resultados muestran que el ELISA de antígeno NPC-1 puede distinguir las diferencias entre el suero de los donantes normales y los pacientes con cáncer colorrectal o pancreático, con un buen nivel de confianza.

La población de pacientes con cáncer probada en este estudio se estratificó aún más por tipo de enfermedad. Este análisis, en la Figura 2B, muestra que no hubo diferencia distinguible por los resultados de la media del ELISA de NEO-101 entre los pacientes diagnosticados con cáncer colorrectal ($n = 36$) de los pacientes diagnosticados con cáncer de páncreas ($n = 5$). Ambos grupos demostraron por separado aproximadamente 0,7 unidades logarítmicas por encima de los niveles de expresión del epítipo NPC-1 comparado con el grupo de donantes sanos.

El epítipo NPC-1 también se puede usar en la monitorización de pacientes con cáncer de colon o páncreas durante el curso de un régimen de tratamiento, al igual que se usan actualmente los ensayos de CEA y CA19-9. Es decir, como un marcador sustituto para un régimen de tratamiento para un paciente con cáncer (si el paciente responde o no). De los pacientes que donaron múltiples muestras de suero, la cantidad de biomarcador de antígeno NPC-1 detectada en el ensayo se representó en función del momento de la extracción de sangre. Los resultados mostraron que algunos pacientes parecían expresar cantidades similares del antígeno NPC-1 durante el período de 2 o 3 meses cuando se extrajo sangre (sujetos 5, 14, 15, 19, 25, 28, 29), mientras que algunos pacientes parecieron experimentar un aumento de 1,5X a 5X en la expresión del antígeno NPC-1 (sujetos 1, 2, 7, 33, 39) o una disminución de 1,2X a 3X en la expresión del antígeno NPC-1 (sujetos 18, 22, 23, 28, 34, 36, 40). La importancia de estos cambios a lo largo del tiempo actualmente no está clara, pero puede estar relacionada con la carga tumoral del paciente en el momento en que se extrajo la sangre, que puede estar directamente relacionada con el régimen de tratamiento específico de los pacientes individuales. Los resultados demuestran tendencias para ciertos pacientes que pueden reflejar regresión, progresión o enfermedad estable del cáncer. Una vez que estos datos se combinan con el estado de la enfermedad en los pacientes, la correlación es evidente. Además, el ensayo con NEO-101 parece ser mejor que cualquiera de los ensayos con CEA y CA19-9 (es decir, NPC-1 es más sensible). Además, ni las pruebas de suero con CEA ni con CA19-9 se pueden usar para diagnosticar cáncer (como si lo hace, por ejemplo, la prueba de antígeno prostático en suero). Por lo tanto, la presente invención proporciona el valor predictivo del epítipo NPC-1 como un nuevo biomarcador sérico para diagnosticar y monitorear el tratamiento del cáncer colorrectal y pancreático.

Ejemplo 6

El epítipo NPC-1 es un glicótopo que comprende un patrón de glicosilación específico de tumor aberrante

El epítipo MUC5AC se mapeo y se caracterizó adicionalmente con el fin de dilucidar mejor la dependencia de carbohidratos de la unión del anticuerpo NEO-101. El sobrenadante de CFPAC-1 (sobrenadante CFPAC-1 de línea celular de cáncer pancreático) que contenía el epítipo NPC-1 se digirió exhaustivamente con termolisina, lo que dio como resultado una actividad no detectable en la transferencia Western con el anticuerpo NEO-101.

Este fue un experimento de dos partes en el que el antígeno (sobrenadante CFPAC-1 de línea celular de cáncer pancreático) se digirió con la proteasa termolisina (Sigma) en una proporción de enzima:sustrato de 1:10. El sobrenadante de CFPAC en regulador TRIS 200 mM, NaCl 500 mM, CaCl₂ 25 mM pH 7,6 durante la noche a aproximadamente 37°C o 65°C. Después de la digestión, la muestra inactivada con enzima (en EDTA) se procesó en geles de SDS-PAGE, después de lo cual se realizó una transferencia Western convencional con el anticuerpo NEO-101 y la detección de peroxidasa IgG antihumana (Jackson Laboratories). Ya no hubo actividad antigénica detectable después de la digestión con termolisina.

El antígeno sobrenadante de CFPAC-1 digerido aún retenía actividad inhibitoria completa en un inmunoensayo de competición en el que el antígeno sobrenadante de CFPAC-1 se recubre sobre una microplaca y la unión de NPC-1-C soluble es seguida por la lectura. Se descubrió que tanto el sobrenadante de CFPAC-1 como su digestión con termolisina se inhibían de una manera similar, pero el filtrado a través de un filtro de centrifugación de corte de 10.000 Dalton no lo hizo. Esto sugirió que el fragmento o fragmentos inhibitorios son superiores a 10.000 daltons pero considerablemente menores que el antígeno nativo observado en el gel.

A continuación, se usó termolisina para fragmentar MUC5AC. Los fragmentos termolíticos de las tres regiones de repetición en tándem de MUC5AC se seleccionaron para construir una alineación múltiple de posibles fragmentos que contienen epítipo que tienen una secuencia de consenso común. Estos experimentos no solo limitaron el tamaño del epítipo prospectivo sino que también sugirieron una posible asociación con la sustitución de carbohidratos ligados a O dada la presencia de motivos. Estos datos indican que un anticuerpo NEO-100 se une a una región de MUC5AC que comprende la secuencia peptídica de la (SEQ ID NO: 34 o 35) que sirve como un andamio para un patrón aberrante de glicosilación específico del tumor. Este patrón aberrante de glicosilación específica del tumor (estructura secundaria) está aparentemente unido a los residuos en las SEQ ID NOs: 34 o 35 contenidos en el antígeno unido por un anticuerpo NEO-100 (por ejemplo, NEO-101, NEO-102, NEO-103).

La dependencia a los carbohidratos de la unión a NEO-101 se confirmó adicionalmente mediante digestiones con enzimas glicosidasas, modificaciones químicas y mimetismo. Se utilizó un panel de glicosidasas (Northstar Bioproducts) para explorar un posible cambio en la capacidad del antígeno sobrenadante de CFPAC-1 para inhibir la unión de NEO-101 al mismo antígeno inmovilizado en microplacas (ensayo de competición). El panel de enzimas comerciales comprendía una pluralidad de enzimas: (a) o-glicosidasa, (b) β 1- \rightarrow 4 galactosidasa, (c) PNGasa F, neuraminidasa específica de α -2- \rightarrow 3,6,8,9, y (d) β -N-acetil glucosaminidasa. De todas las enzimas analizadas, la neuraminidasa (selectiva de 3, 6, 8) se destacó por producir modificaciones significativas en el antígeno. Esto se observó en el ELISA de competencia utilizando placas recubiertas con CFPAC y NEO-101. Sorprendentemente, del tratamiento con o-glicosidasa, (b) β 1- \rightarrow 4 galactosidasa, (c) PNGasa F, neuraminidasa específica de α -2- \rightarrow 3,6,8,9, y (d) β -N-acetil glucosaminidasa, solamente la digestión con neuraminidasa eliminó la actividad del antígeno. Inesperadamente, se observó que la actividad antigénica es sensible a la neuraminidasa, un tratamiento suave de oxidación con peryodato de sodio a 4°C (un método que destruye selectivamente los grupos hidroxilo sensibles unidos al diol vecino encontrados en los ácidos siálicos) también eliminó la unión de NEO-101 al MUC5AC.

Los resultados de la digestión con neuraminidasa sugieren que el ácido siálico está contenido en los residuos de carbohidratos que están unidos a los aminoácidos en la estructura primaria del antígeno que constituye el epítipo. Una neuraminidasa de *Macrobacteria decora* (Calbiochem) que es selectiva para los enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$ era inactiva. Solo la neuraminidasa con amplio espectro ($\alpha 2 \rightarrow 3, 6, 8$) de *Arthrobacter ureafaciens* mostró actividad. Dado que el ácido siálico unido $\alpha 2 \rightarrow 8$ es relativamente poco frecuente, excepto en los tejidos neuronales, los resultados sugieren fuertemente que el epítipo contiene enlaces de tipo $\alpha 2 \rightarrow 6$ de ácido siálico. El tratamiento con peryodato reduce aún más la unión para incluir grupos hidroxilo C8 y C9 en ácido siálico como posibles puntos de contacto con NEO-101. También se efectuó un ensayo de competición que compara el sobrenadante de CFPAC-1 tratado con $\alpha 2 \rightarrow 3$ neuraminidasa, $\alpha 2 \rightarrow 3, 6, 8$ neuraminidasa y peryodato de sodio con un control de CFPAC-1. Solamente el sobrenadante de CFPAC-1 tratado con $\alpha 2 \rightarrow 3$ neuraminidasa y peryodato de sodio mostró una falta de unión del anticuerpo NEO-101. Por lo tanto, el antígeno detectado en el ELISA de suero unido por el anticuerpo NEO-101 también es sensible a peryodato de sodio y $\alpha 2 \rightarrow 3$ neuraminidasa pero no a $\alpha 2 \rightarrow 3, 6, 8$ neuraminidasa.

El suero de un individuo sano normal (suero normal) o suero de un paciente con cáncer de colon se trató durante la noche con varias concentraciones de peryodato de sodio. La reacción se detuvo mediante la adición de glicerol al 50%. Las muestras tratadas se analizaron para determinar el contenido de epítipo NPC-1 mediante ELISA utilizando el anticuerpo NEO-101 en un formato homólogo en el que NEO-101 fue tanto el reactivo de captura como el reactivo detector en forma biotinilada.

Se descubrió inesperadamente una forma de mimetismo en la que la mucina submaxilar bovina (BSM) (Sigma) se unía muy bien a NEO-101 en ELISA y transferencia Western. Este antígeno de reactividad cruzada proporcionó una fuente de material para explorar más a fondo la dependencia de carbohidratos de la unión de NEO-101. La reactividad de BSM con el anticuerpo NEO-101 fue sensible a los tratamientos con peryodato y con neuraminidasa. El ensayo de competición que compara el sobrenadante de CFPAC-1 con BSM sobre la capacidad de inhibir la unión del anticuerpo NEO-101 a placas recubiertas con CFPAC.

El BSM o sobrenadante de CFPAC-1 se trató con peryodato de sodio y se neutralizó esencialmente como se describió anteriormente. Los antígenos tratados se recubrieron luego sobre una microplaca que posteriormente se sondó con una titulación del anticuerpo NEO-101. La lectura después de una etapa de unión del anticuerpo secundario anti-IgG-humana- peroxidasa (Jackson) se obtuvo con el sustrato TMB. Esto muestra que BSM y el antígeno sobrenadante de CFPAC-1 tienen ambos una sensibilidad similar al peryodato con respecto al epítipo NPC-1. Este resultado es consistente con los experimentos de hidrólisis ácida suave que apuntan a un glicótopo parcial de ácido siálico común.

La unión de NEO-101 a su antígeno o antígenos es sensible a la sal, apoyando además el descubrimiento de que la unión puede tener una dependencia iónica, con contribución de residuos de ácido siálico cargados negativamente en el antígeno. La placa recubierta del sobrenadante de CFPAC-1 fue una captura y la lectura fue la unión del anticuerpo NEO-101 en presencia de varias concentraciones de NaCl. El anticuerpo monoclonal NPC-1 se comparó con el anticuerpo monoclonal Sialyl Tn (Abcam) y los anticuerpos que se unen al antígeno CA19-9. Con la placa recubierta con BSM como captura y una cantidad variable añadida de NEO-101, se añadió una cantidad constante de anticuerpo sialil Tn dando como resultó una no competición de la unión de NEO-101. Cuando se probó sialil Tn en el bloqueo previo de una placa con BSM, no se produjo tal bloqueo de la unión de NEO-101. El 50% de los glicanos enlazados a O en BSM tienen la siguiente secuencia que se define por la unión de anticuerpos a Sialyl Tn: NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 6$ GalNAc $\alpha 1 \rightarrow$ Ser/Thr. La digestión selectiva con neuraminidasa mostró que el epítipo reconocido por el anticuerpo NEO-101 comprende un enlace NeuAc $\alpha 2 \rightarrow 6$. Los experimentos de bloqueo del anticuerpo Sialyl Tn demostraron que NEO-101 y Sialyl Tn no comparten un epítipo ya que no hay competencia para la unión entre estos anticuerpos (por ejemplo, Sialyl Tn se une a un epítipo diferente). Estos resultados también sugieren que el epítipo reconocido por NEO-101 es sensible a la eliminación de ácido siálico unido a $\alpha 2 \rightarrow 6, 8$ pero no al ácido siálico unido $\alpha 2 \rightarrow 3$, lo que excluye a CA19-9 como antígeno. Además, el epítipo es sensible a la oxidación suave de peryodato, lo que sugiere que los grupos hidroxilo del ácido siálico C8, C9 pueden ser sitios de contacto con NEO-101 o mucina. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal sialil Tn no se une al mismo epítipo que un anticuerpo NEO-100. Además, un anticuerpo NEO-100 no se une al antígeno CA19-9.

Por consiguiente, el epítipo NPC-1 es sensible a la hidrólisis ácida suave, la oxidación con peryodato y la digestión con neuraminidasa, todos los tratamientos conocidos por provocar un efecto degradante sobre el ácido siálico, y sugieren que el ácido siálico es un azúcar clave que forma parte del glicótopo reconocido por un anticuerpo NEO-100. Además, se sugirió que el enlace del ácido siálico con el penúltimo azúcar del epítipo es $\alpha 2 \rightarrow 6$ en lugar de $\alpha 2 \rightarrow 3$ en virtud del efecto destructivo del epítipo que solo se observa con la neuraminidasa de *Arthrobacter ureafaciens* (neuraminidasa de amplio espectro) y no con neuraminidasa de *Macrobacteria decora* selectiva solo para enlaces $\alpha 2 \rightarrow 3$. Además, el anticuerpo NEO-101 se une eficazmente a la mucina submaxilar bovina (BSM) y al digerido proteolítico de la misma. Esto sugiere que existe un glicótopo homólogo en BSM y hay una relevancia disminuida de la parte peptídica de la molécula. El epítipo NPC-1 es sensible a la sal, lo que sugiere la importancia de los residuos cargados, posiblemente debido a los residuos de ácido siálico agrupados negativamente que tienen el carácter iónico apropiado.

Ejemplo 7

Datos de farmacología y de toxicología.

Mecanismo de acción propuesto de NEO-101.

5 El anticuerpo NEO-101 se analizó para determinar la actividad de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) frente a varios objetivos de células tumorales colorrectales y pancreáticas *in vitro*. El ensayo ADCC mide la cantidad de citotoxicidad celular que un anticuerpo facilita en un período de tiempo definido mediante la liberación de proteínas citoplasmáticas radiomarcadas en el medio de cultivo. Los datos muestran que en un ensayo estándar de liberación de Indio 111 en 4 horas, que NEO-101 facilitó la destrucción de las líneas celulares tumorales colorrectales y pancreáticas. La actividad lítica específica de NEO-101 se demuestra con un control de isotipo IgG y controles de línea celular que no expresan el antígeno MUC5AC (DU145 y SK-mel). Véase la Tabla 9. La actividad lítica específica fue titulable con el número de células efectoras en el ensayo.

10 Tabla 9. Ensayo ADCC: Destrucción con anticuerpo NEO-101 contra líneas celulares tumorales

Línea Celular Objetivo Tumor	Relación Células Efectoras:Objetivo	% de destrucción específica (±SEM)	
		Ab control de isotipo	NEO-101
Colo-205 (Colorrectal)	50:1	9,8 ± 1,9	66,7 ± 0,6
	25:1	0,8 ± 1,2	46,4 ± 1,6
	12,5:1	-0,5 ± 0,1	32,8 ± 2,0
SW620 (Colorrectal)	50:1	1,6 ± 0,2	63,7 ± 2,9
	25:1	3,5 ± 1,8	61,0 ± 1,8
	12,5:1	0,0 ± 0,3	51,5 ± 0,9
SW1463 (Colorrectal)	50:1	0,1 ± 1,1	33,8 ± 1,0
	25:1	-1,3 ± 0,2	25,5 ± 0,6
	12,5:1	-1,2 ± 0,1	17,9 ± 1,7
LS174T (Colorrectal)	50:1	-1,2 ± 0,1	26,8 ± 2,9
	25:1	-0,8 ± 0,1	18,5 ± 4,1
	12,5:1	-1,1 ± 0,0	9,5 ± 0,5
AsPC-1 (Pancreático)	50:1	-0,8 ± 2,9	44,5 ± 6,8
	25:1	-7,0 ± 2,2	36,2 ± 2,6
	12,5:1	-1,2 ± 0,9	26,5 ± 6,7
CFPAC-1 (Pancreático)	50:1	-1,2 ± 2,3	26,9 ± 1,6
	25:1	-2,4 ± 0,2	23,2 ± 2,2
	12,5:1	-2,0 ± 0,4	11,1 ± 1,6
PANC-1 (Pancreático)	50:1	-2,2 ± 0,4	46,8 ± 2,1
	25:1	-2,5 ± 0,4	33,2 ± 3,3

	12,5:1	-3,9 ± 0,3	21,2 ± 0,6
SK-MEL (Melanoma)	50:1	2,7 ± 0,7	4,6 ± 1,1
	25:1	1,5 ± 0,3	3,3 ± 1,1
	12,5:1	1,6 ± 0,4	2,3 ± 0,6
DU145 (Próstata)	50:1	-0,3 ± 0,2	-0,5 ± 0,3
	25:1	-0,7 ± 0,1	0,3 ± 0,8
	12,5:1	-0,2 ± 0,2	-0,3 ± 0,1

Estos resultados *in vitro* demuestran que el anticuerpo NEO-101 fue capaz de dirigir la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en presencia de PBMC humanas normales.

Actividad antitumoral

5 El anticuerpo NEO-101 se analizó para determinar la actividad antitumoral utilizando el modelo de xenoinjerto de tumor de páncreas humano AsPC-1 en ratones desnudos. En este modelo de actividad, se implantaron los ratones con células tumorales de AsPC-1 humanas y se dejaron establecer hasta aproximadamente 20-50 mm³, medibles con un calibrador en aproximadamente 4-6 días. El régimen de tratamiento incluyó una inyección intraperitoneal de 200 µg de NEO-101 de grado de investigación o una IgG humana de control negativo (Pierce), seguido al día siguiente con una inyección intraperitoneal de PBMC humanas normales activadas con IL-2 (aproximadamente 2 x 10⁷ por ratón por inyección). Se administraron dos ciclos de tratamiento, de modo que las inyecciones de anticuerpos se produjeron en los días 5 y 8, y las inyecciones de PBMC se produjeron en los días 6 y 9 de este estudio. A lo largo del estudio, el crecimiento del tumor se controló dos veces por semana mediante la medición con un calibrador. El volumen del tumor se calculó utilizando la ecuación: Volumen = (ancho x largo)/2, en unidades de milímetros cúbicos. Si un tumor alcanzaba aproximadamente 800 mm³, o se ulceraba o era necrótico, el ratón se sacrificaba humanamente. El estudio finalizó el día 35 del estudio.

La Figura 3 demuestra el crecimiento promedio del tumor para cada grupo graficados en conjunto. La inhibición del crecimiento tumoral se observó durante la fase de tratamiento con anticuerpos del estudio, y la diferencia entre los ratones tratados con NEO-101 y los grupos de control fue estadísticamente significativa a partir del día 13 y continuando durante el resto del estudio (p = 0,0072 por ANOVA de una vía), como lo indica el asterisco en la gráfica.

Este estudio de actividad antitumoral se repitió en un estudio separado utilizando el mismo modelo de tumor de páncreas AsPC-1 y la dosis de 200 µg de anticuerpo NEO-101. Sin embargo, en el segundo estudio, se administraron cuatro ciclos de tratamiento en lugar de dos ciclos. El anticuerpo se administró los días 4, 7, 10 y 13 en este estudio, mientras que las PBMC se inyectaron los días 5, 8, 11 y 14. Todos los demás parámetros se mantuvieron igual que en el estudio anterior. Los datos mostrados en la Figura 4 demuestran una inhibición del crecimiento muy similar en respuesta al tratamiento con NEO-101. La inhibición del tumor fue evidente durante la fase de tratamiento del estudio, y la diferencia entre los ratones tratados con NEO-101 y los ratones de control con IgG humana fue estadísticamente significativa a partir del día 18 y continuando durante el resto del estudio (p = 0,0044 por ANOVA de una vía; n = 8 por grupo). El hecho de que estos dos estudios independientes de actividad anti-AsPC-1 arrojaran resultados similares apoya la utilidad del anticuerpo NEO-101 para el tratamiento del cáncer pancreático y colorrectal.

Dado que la línea celular de tumor colorrectal LS174T sirvió como un buen objetivo *in vitro* en el ensayo ADCC, esta línea celular se usó en un modelo de tumor de xenoinjerto. Las células LS174T se implantaron por vía subcutánea en ratones desnudos y se administró el mismo régimen de tratamiento a estos ratones. Los datos mostrados en la Figura 5 demuestran que este es un tumor muy agresivo *in vivo* por lo que el estudio tuvo que terminarse en menos de 3 semanas. No obstante, se observó una reducción de 2-3 veces en el crecimiento del tumor en ratones tratados con NEO-101 en comparación con los 2 grupos de ratones de control después de los ciclos de tratamiento. El efecto antitumoral sobre el tratamiento con NEO-101 fue significativo en el último día de medición de tumores con P = 0,0145 por ANOVA de una vía. Sin embargo, muchos de los tumores en los grupos de control se ulceraron y fueron mayores de 1000 mm³ y se terminó el estudio.

40 Respuesta de citoquinas

En un estudio preliminar diseñado para evaluar las posibles respuestas de citoquinas *in vivo*, a los ratones BALB/c normales se los inyectó en forma intravenosa con 3,5 mg/kg o 14 mg/kg (5 ratones por grupo) de NEO-101 de grado

de investigación. La sangre se recogió el día 3 del estudio (72 horas después de la inyección) y el día 10 del estudio. Se preparó suero (incluido el sangrado previo de cada ratón) y se analizó la presencia de IL-2, IFN- γ , IL-4, e IL-5 de ratón en un ensayo de perlas múltiple utilizando el servicio SearchLight Array ofrecido por Aushon BioSystems, Inc.

- 5 Los datos demostraron que hubo un pequeño aumento en los niveles en suero de IL-2 e IL-5, pero no hubo un cambio apreciable en IFN- γ o IL-4 en el día 3. No parece haber relación con la dependencia de la dosis para el aumento de IL-2 o IFN- γ , y la elevación menor de estas 2 citoquinas mostró evidencia de que comenzó a resolverse en el día 10. Por lo tanto, en este estudio se observó una pequeña y aparentemente transitoria respuesta de citoquinas que podría esperarse tras la inyección de un bolo de proteína foránea en un ratón.

Respuesta de anticuerpos

- 10 En este estudio también se midieron las respuestas del anticuerpo anti-NEO-101 de ratón (MAHA) (CB08-5110). El análisis empleó un ensayo basado en ELISA para detectar anticuerpos específicos contra NEO-101 en suero de ratón. Los datos demostraron que los ratones BALB/c normales montaron una respuesta de anticuerpos contra la molécula NEO-101. Sin embargo, las respuestas de anticuerpos fueron altamente variables de ratón a ratón, y las respuestas generales fueron moderadas, lo que sugiere que el anticuerpo NEO-101 fue solo ligeramente inmunogénico en ratones a pesar del hecho de que está comprendido en el 67% de las secuencias de IgG humana. No hubo diferencias entre las respuestas MAHA de ratón macho y hembra.

Toxicidad

- 20 También se realizó un estudio preliminar de toxicidad sin GLP usando una preparación grado investigación de NEO-101. A los ratones BALB/c normales se inyectaron con una dosis intravenosa única de solución salina, o 3, 10, 30 o 100 mg/kg de NEO-101 ($n = 3$ ratones hembras por grupo). Los parámetros de vida medidos incluyeron pesos corporales y observaciones clínicas. Los ratones se sacrificaron humanamente 72 horas después de la inyección y se recogieron muestras para su análisis. Los parámetros post-mortem incluyeron examen macroscópico, conteos de células sanguíneas, química del suero y evaluación histopatológica de órganos y tejidos principales seleccionados. Los resultados del estudio preliminar no demostraron cambios significativos en el peso corporal, los recuentos de células sanguíneas y la histopatología de 7 órganos y tejidos principales (hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, intestino, páncreas). Se observó una elevación leve, pero estadísticamente insignificante, de la aspartato transaminasa sérica (AST) en 2 de cada 3 ratones que recibieron 100 mg/kg de NEO-101. No se detectaron otras toxicidades en estos estudios potencialmente asociados con NEO-101, incluso durante el examen histopatológico de los principales sistemas orgánicos en estos ratones.

30 Farmacocinética

- Para determinar si el género afectó la disposición de NEO-101 *in vivo*, cada grupo de tratamiento contenía cuatro machos y cuatro hembras. La eliminación, la $C_{m\acute{a}x}$ y la semivida después de una dosis única de 10 o 100 mg/kg se compararon mediante la prueba no paramétrica de Mann-Whitney. No se observaron diferencias significativas específicas de género en la eliminación o $C_{m\acute{a}x}$. Sin embargo, la semivida en suero de NEO-101 fue más corta en hembras que en machos. Este hallazgo solo fue significativo al nivel de dosis de 100 mg/kg ($t_{1/2}$: $109,5 \pm 14,72$ h frente a $285,4 \pm 139,5$ h, $P = 0,029$). Sin embargo, es probable que se trate de una observación espuria, que surge de una alta variabilidad entre animales, ya que esta diferencia en la semivida no se replicó después de múltiples dosis, independientemente del nivel de dosis.

- 40 Los datos proporcionan una guía útil para el calendario de dosificación de posibles regímenes terapéuticos. Los ratones inyectados por vía intravenosa con 10 mg/kg de NEO-101 pueden usarse para comparación con las dosis utilizadas en regímenes de terapia para humanos, por ejemplo. En general, la disposición del anticuerpo NEO-101 en ratones se caracteriza por una baja eliminación, un volumen limitado de distribución y una larga semivida de eliminación. La semivida media con 10 mg/kg fue de 129 horas (5,4 días) después de una dosis única, aumentando a 279 horas (11,6 días) después de cuatro dosis, lo que debería permitir una exposición adecuada cuando se administra cada 2-3 semanas en un ensayo clínico.

Biodistribución

- 50 La biodistribución del anticuerpo NEO-101 se evaluó en ratones portadores de tumores usando un anticuerpo radiomarcado. El anticuerpo NEO-101 se marcó en tirosinas expuestas en la superficie con yodo 125 y se purificó mediante cromatografía de filtración en gel. Ratones desnudos con tumores pancreáticos subcutáneos humanos establecidos (CFPAC-1) o tumores colorrectales (LS174T) se inyectaron por vía intravenosa con NEO-101 radioyodado el día 0. Los ratones se sacrificaron en los días 1, 2, 4 y 6 del estudio. Los días de la necropsia, los ratones se desangraron y se recogieron los órganos principales (por ejemplo, pulmones, intestino, hígado, páncreas, bazo, riñones, sangre), incluido el tumor subcutáneo.

- 55 Los datos muestran que el NEO-101 radiomarcado se localizó predominantemente en los xenoinjertos tumorales establecidos que se sabe que expresan el antígeno objetivo MUC5AC y no en otros tejidos no objetivo examinados. En el modelo de tumor pancreático CFPAC-1, la captación de NEO-101 fue estadísticamente mayor en los tumores que en cualquier otro tipo de tejido en todos los puntos de tiempo, excepto cuando se comparó con los de la sangre

en hembras solo en el día 6. Curiosamente, los ratones que albergan el tumor colorrectal LS174T demostraron una captación de NEO-101 que aumentó en ambos sexos y alcanzó los niveles más altos en el día 6. La captación fue estadísticamente mayor en los tumores que en cualquier otro tipo de tejido examinado en cualquier momento durante el estudio. Estos estudios apoyan la idea de que NEO-101 puede circular al sitio del tumor después de la administración intravenosa del anticuerpo, donde puede unirse al antígeno objetivo, acumularse en el sitio del tumor y provocar un efecto antitumoral.

La biodistribución de NEO-101 en el modelo de tumor pancreático CFPAC-1 se usó para estudiar la concentración del anticuerpo NEO-101 en tumores en el transcurso de 6 días. Los ratones fueron inyectados con 3×10^6 CFPAC-1 y se dejaron crecer hasta 50-100 cm³. Posteriormente, se inyectó NEO-101 marcado con ¹²⁵I a razón de 400 µg/mL en 200 µL de PBS y se sacrificaron los ratones. Los órganos se recogieron y la cantidad de NEO-101 marcada con ¹²⁵I se contó y se normalizó para sangre. Los datos demostraron la localización y acumulación de NEO-101 radiomarcado en el sitio del tumor *in vivo*, mientras que ninguno de los sistemas de órganos principales (por ejemplo, riñones, bazo, páncreas, estómago, pulmones, hígado, intestinos) exhibió un enriquecimiento de NEO-101 radiomarcado.

La biodistribución de NEO-101 en el modelo de tumor colorrectal LS174T se estudió utilizando el anticuerpo NEO-101 en tumores a lo largo de 6 días. Los ratones fueron inyectados con 3×10^6 células LS174T y se dejaron crecer hasta 50-100 cm³. Posteriormente, se inyectó NEO-101 marcado con ¹²⁵I a razón de 400 µg/mL en 200 µL de PBS y se sacrificaron los ratones. Los órganos se recogieron y la cantidad de NEO-101 marcada con ¹²⁵I se contó y se normalizó para sangre. Los datos demuestran la localización y acumulación dependientes del tiempo de NEO-101 radiomarcado en el sitio del tumor *in vivo*, mientras que ninguno de los sistemas de órganos principales (por ejemplo, riñones, bazo, páncreas, estómago, pulmones, hígado, intestino) exhibió un enriquecimiento de NEO-101 radiomarcado.

En resumen, los resultados, particularmente la actividad de ADCC *in vitro* y la actividad antitumoral *in vivo* apoyan el uso de NEO-101 como un agente terapéutico para pacientes con cáncer que expresan el antígeno objetivo del tumor, NPC-1. La tinción tisular con NEO-101 reveló una fuerte correlación positiva con los tejidos con cáncer de colon y páncreas debido a la poca o ninguna reactividad cruzada con el páncreas humano normal o el tejido de colon, y no se observó reactividad cruzada con otros tejidos normales. Los datos farmacocinéticos demuestran que la semivida en suero de NEO-101 en ratones se encuentra dentro de un rango similar en comparación con otras inmunoglobulinas terapéuticas, y apoya la administración del anticuerpo cada dos a tres semanas. El estudio de biodistribución demostró la capacidad del anticuerpo NEO-101 para el tráfico y la acumulación en tumores establecidos, lo que sugiere que un anticuerpo NEO-100 se puede usar como vehículo de suministro para agentes de suministro (por ejemplo, agentes o marcadores citotóxicos) directamente a los tumores.

Ejemplo 8

Detección del epítipo NPC-1 en muestras fecales

Las heces son una fuente rica de células derivadas del tracto gastrointestinal, y los antígenos de cáncer pueden medirse en muestras fecales utilizando técnicas estándar, por ejemplo, inmunoquímica como ELISA. Kim, et al. (2003) *Annals Clin. & Lab. Sci.* 33: 32-38; T0n, et al., (2000) *Clin. Chimica Acta.* 292: 41-54. Se desarrolló un ELISA de formato homólogo que utiliza el anticuerpo NEO-101 como reactivo de captura y detección. Un experimento de control preliminar con sobrenadante de células tumorales CFPAC-1 pancreáticas humanas (que contiene el antígeno NPC-1) impregnado en una muestra de heces sanas mostró que las heces no interfirieron con el ELISA. A continuación, muestras de heces recolectadas durante la colonoscopia de pacientes con cáncer colorrectal (n = 4), heces de personas con pólipos pequeños (n = 4), heces de personas con pólipos múltiples (n = 2), heces de personas con pólipos grandes (n = 3), y heces de adultos sanos (n = 13) se aplicaron al ELISA. Se preparó un extracto soluble de heces por lisis con detergente y centrifugación. El nivel de epítipo NPC-1 específico de NEO-101 medido en este ELISA se comparó entre todos los grupos. La Tabla 10 muestra los datos de dos experimentos independientes en los que algunas muestras se enriquecieron con la línea celular CFPAC-1 derivada de carcinoma del conducto pancreático:

Tabla 10: Detección del epítipo NPC-1 en extractos fecales humanos por ELISA

Muestra	Experimento 1		Experimento 2	
	extracto 1/10	extracto 1/50	extracto 1/10	extracto 1/50
1 muestra fecal de donante sano	285*	187	204	159
2 muestra fecal de paciente con enfermedad celíaca	291	204	224	181
3 muestra fecal de paciente con pólipos	855	281	723	231
4 muestra fecal de paciente con cáncer de colon (hiperplasia)	3629	757	3217	624

5 muestra fecal de paciente con cáncer de colon	5137	1043	ND	ND
muestra 1 con adición de 10 µL de sobrenadante de CFPAC-1	1944	461	1354	346
muestra 2 con adición de 10 µL de sobrenadante de CFPAC-1	2045	438	ND	ND
muestra 3 con adición de 10 µL de sobrenadante de CFPAC-1	3219	582	ND	ND
muestra 4 con adición de 10 µL de sobrenadante de CFPAC-1	5926	1373	ND	ND
muestra 5 con adición de 10 µL de sobrenadante de CFPAC-1	7692	1694	ND	ND
Sobrenadante de CFPAC-1	2902	ND	2772	ND
Sobrenadante de HTB 35	143	ND	82	ND

* los números representan equivalentes/mL de células positivas para el epítipo NPC-1

ND = no hecho

HTB-35 = sobrenadante de control negativo para el epítipo NPC-1

5 Los resultados del uso del sobrenadante de CFPAC-1 como fuente sustituta del antígeno NPC-1 mostraron que los contenidos de material fecal no interfirieron con la capacidad del ELISA para medir el epítipo NPC-1 reactivo con el anticuerpo NEO-101. Cuando se aplicaron extractos de heces al ELISA, fue evidente que las personas sanas no expresaron el epítipo NPC-1 reactivo al anticuerpo NEO-101 en sus heces. La señal en el ensayo fue similar a los niveles de fondo (promedio de aproximadamente 723 unidades). En contraste, las personas con pólipos pequeños tuvieron niveles más altos (promedio de aproximadamente 3.819 unidades); las personas con múltiples pólipos expresaron niveles más altos (promedio de aproximadamente 7.369 unidades); las personas con pólipos grandes tenían niveles aún más altos (un promedio de aproximadamente 10.189 unidades); y los pacientes con cáncer de colon tenían los niveles más altos de antígeno reactivo NEO-101 (un promedio de aproximadamente 175.983 unidades), más de aproximadamente 240 veces el nivel de epítipo NPC-1 en comparación con las personas sanas. El ELISA que usa el anticuerpo NEO-101 (para detectar el epítipo NPC-1) es un ensayo específico y útil para el diagnóstico y monitoreo del cáncer de páncreas usando muestras de heces. Los inhibidores de ELISA del anticuerpo NEO-101 no están presentes en los extractos fecales. El ensayo es titulable y puede ser cuantitativo. Véase también la Figura 1.

20 Estos datos establecen un nivel de correlación del antígeno reactivo NEO-101, medido por un nuevo ELISA con base en heces, con progresión de la enfermedad de cáncer de colon. El nivel de epítipo NPC-1 específico de NEO-101 detectado aumentó concomitantemente con el número y el tamaño de los pólipos observados durante la colonoscopia, y alcanzó los niveles más altos en pacientes con cáncer de colon. Por lo tanto, esta prueba de ELISA proporciona una detección diagnóstica no invasiva temprana para el cáncer colorrectal utilizando un anticuerpo anti-NEO-101.

Ejemplo 10

El anticuerpo NEO-101 muestra efectos antitumorales *in vitro* e *in vivo*

25 Introducción: NEO-101 es un anticuerpo monoclonal quimérico que se puede usar para el tratamiento de cánceres pancreáticos y colorrectales. El anticuerpo NEO-101 parece reconocer una forma variante de MUC5AC expresada específicamente por tejidos y líneas celulares tumorales pancreáticas y colorrectales humanas.

30 Métodos: El anticuerpo NEO-101 se seleccionó de un panel de hibridomas generados a partir de ratones inmunizados con proteínas asociadas a la membrana semipurificada derivada de tejidos de cáncer de colon alogénico humano agrupados y seleccionados biológicamente. Se realizaron ensayos *in vitro* y estudios *in vivo* para caracterizar el anticuerpo de grado GMP.

Inmunohistoquímica (IHC)

35 Los portaobjetos se desparafinaron, se rehidrataron y se realizó la recuperación del antígeno. Los portaobjetos se tiñeron con 10 µg/mL de anticuerpo NEO-101 biotinilado y luego se aplicó estreptavidina-HRP para el desarrollo de color. Los portaobjetos se tiñeron a contracorriente con H.E., se hidrataron y se fijaron. Los resultados demuestran la unión de NEO-101 específica para tejido tumoral pancreático o colorrectal, pero no una unión a páncreas normal o tejido de colon. Véase la Tabla 1 1. La especificidad de NEO-101 por tejido tumoral pancreático y colorrectal se demostró además tiñendo tejido tumoral de pulmón. Si bien hubo una unión significativa a estos tejidos con un

anticuerpo comercial que reconoce MUC5AC normal, no hubo reactividad de NEO-101 con estos tejidos tumorales de pulmón.

TABLA 11: Especificidad del anticuerpo NEO-101

Tipos de tejido	Muestras teñidas de tejido total	Porcentaje positivo
Cáncer de colon	38	79%
Pancreático normal	29	3%
Cáncer Pancreático	108	48%
Útero normal	12	0
Cáncer de útero	50	44%
Próstata normal	4	0
Cáncer de próstata	40	25%

5 Datos de FACS que muestran la unión del anticuerpo NEO-101 a líneas celulares de cáncer de colon y cáncer pancreático. Las células se lavaron y se suspendieron en 2 µg/mL de NEO-101-FITC o anticuerpo de control de isotipo-FITC durante 1 hora, se lavaron y luego se sometieron a análisis FACS. Los experimentos con todas las líneas celulares se repitieron al menos tres veces. El anticuerpo NEO-101 reacciona con los tejidos tumorales colorrectales y pancreáticos, pero no reacciona de forma cruzada con los tejidos humanos normales, excepto por la unión esporádica y débil a ciertos tejidos del tracto GI, lo que puede indicar un estado premaligno. El anticuerpo NEO-101 se une a las células cancerosas según lo observado por los resultados de la tinción de inmunofluorescencia (IF) utilizando un anticuerpo NEO-101 marcado con FITC (2 µg/mL) en la línea celular de cáncer pancreático AsPC-1, la línea celular de cáncer colorrectal LS174T, pero no se une a la línea celular de cáncer de pulmón A549. Se utilizó DAPI para teñir el núcleo. La IF mostró una tinción específica clara de las células pancreáticas y colorrectales, pero no de las células cancerosas del pulmón. El patrón de tinción de estas células tumorales pancreáticas y colorrectales fue predominantemente asociado a la membrana, consistente con el perfil de expresión de MUC5AC. Véase la Tabla 12.

Tabla 12: Anticuerpo NEO-101 que se une a las líneas celulares tumorales pancreática y colorrectal

Líneas celulares tumorales	Control de isotipo (Porcentaje positivo)	NEO-101 (Porcentaje positivo)
LS174	3,85	89,72
Colo-205	2,33	94,67
SW480	3,38	58,98
CFPAC	1,79	52,56

20 El anticuerpo NEO-101 exhibe unión específica a células y actividad ADCC contra células tumorales colorrectales y pancreáticas humanas, pero no contra líneas celulares tumorales de control. *In vivo*, la actividad antitumoral del anticuerpo NEO-101 se probó utilizando modelos de xenoinjerto de tumor humano subcutáneo preestablecido. Sorprendentemente, el anticuerpo NEO-101 mostró una acción antitumoral significativa y reproducible, incluidas algunas regresiones tumorales completas.

25 Los resultados en este documento muestran que el anticuerpo NEO-101 puede unirse específicamente a muestras de tejido de cáncer de páncreas y de colon y también a líneas celulares. El anticuerpo NEO-101 puede inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos en células pancreáticas y de colon, pero no en melanoma y cáncer de próstata. Los estudios *in vivo* sugieren que el anticuerpo NEO-101 inhibe el crecimiento de tumores en modelos de xenoinjerto de cáncer pancreático y de colon. Los estudios de biodistribución mostraron que el anticuerpo NEO-101 se acumula en el tumor y no en ningún órgano importante. Hubo respuestas de citoquinas tipo I y II leves y respuestas esperadas de anticuerpos en ratones tratados con NEO-101. Por lo tanto, el anticuerpo NEO-101 es específico para el cáncer de páncreas y de colon, e induce la actividad de ADCC en ensayos *in vitro* e inhibe el crecimiento de tumores *in vivo*.

En particular, los datos disponibles relacionados con el anticuerpo NEO-101 indican que debe ser seguro y eficaz, y que puede tener actividad clínica en pacientes cuyo tumor expresa la variante del epítipo MUC5AC. De hecho, este anticuerpo debe tener una gran relevancia clínica ya que aproximadamente el 50-70% de los tejidos tumorales humanos pancreáticos y de colon expresan un antígeno NPC-1 (como lo demuestra la tinción positiva).

5 Ejemplo 11

bioselección

La técnica de bioselección utiliza bibliotecas de péptidos recombinantes de presentación en fagos, típicamente basadas en péptidos recombinantes relativamente cortos fusionados a una proteína de recubrimiento de fagos. La presentación en fagos describe una técnica de selección en la que una biblioteca de variantes de un péptido o proteína se expresa en el exterior de un virión de fago, mientras que el material genético que codifica cada variante reside en el interior. Véase, por ejemplo, Sidhu, et al. (2003) *Chembiochem* 4 (1): 14-25; Ferrer, et al. (1999) *J. Pept. Res.* 54 (1): 32-4-2; BouHamden, et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273 (14): 8009-8016; y Whaley, et al. (2000) *Nature* 405 (6787): 665-667.

Por ejemplo, la biblioteca de péptidos de presentación en fagos PH.D.^{MR}- 12 es una biblioteca recombinatoria de dodecapéptidos aleatorios fusionados con la proteína de la cubierta menor (pIII) del fago M13. El péptido de 12 mer mostrado se expresa en el extremo terminal N, seguido por un péptido espaciador corto (GGGS), y luego la secuencia pIII de tipo silvestre. La biblioteca consta de aproximadamente $2,7 \times 10^9$ secuencias amplificadas una vez para producir aproximadamente 100 copias de cada secuencia en 10 μ L de fago. El 4B6 Id se puede usar en inmunoensayos competitivos para liberar fagos unidos a NEO-101 en bioselección (por ejemplo, usando el sistema de presentación de fagos de la biblioteca M13 Ph.D.^{MR}-I2) para identificar epítipos NEO-101. 4B6 es un anticuerpo antiidiotípico descrito en la Solicitud Internacional de Patente No. PCT US2011/41503.

Más específicamente, el enriquecimiento de fagos clonales mediante titulación de fagos usó varias rondas de bioselección. La primera ronda de bioselección capturó una mezcla de NEO-101-biotina y presentó el fago en una placa recubierta con estreptavidina, y el fago unido se liberó con 100 μ g/mL de 4B6 en Tween® 20 al 0,1% (detergente no iónico de polisorbato 20), y produjo $1,6 \times 10^3$ pfu/10 μ L. En otra ronda de bioselección, se acopló el anticuerpo NEO-101 a perlas Dynal®, y el fago unido se liberó mediante 100 μ g/mL de 4B6 en Tween® 20 al 0,1%, produciendo $1,1 \times 10^6$ pfu/10 μ L. Otra ronda de bioselección capturó una mezcla de anticuerpo NEO-101 y fago con la proteína G-agarosa, y el fago unido se liberó con 200 μ g/mL de 4B6 en Tween® 20 al 0,5%, lo que resultó en $4,5 \times 10^5$ pfu/10 μ L. Otra ronda de bioselección capturó una mezcla de anticuerpo NEO-101 y fago con la proteína A-agarosa, y el fago unido fue liberado por 200 μ g/mL de 4B6 en Tween® 20 al 0,5%, y produjo $1,3 \times 10^6$ pfu/10 μ L. Doce clones de fagos de cada una de las tres rondas de bioselección fueron seleccionados para el análisis de secuencia. Los péptidos resultantes se muestran en la Figura 6.

Los clones M13 identificados a partir de varias rondas de bioselección se probaron por ELISA. Partes alícuotas de 100 μ L/pozo de NEO-101 (1 μ g/mL en regulador CBS) en una placa de 96 pozos se incubaron a 4°C durante la noche. Los pozos se lavaron luego tres veces con TBST (Tween al 0,05%). La unión no específica se inhibió mediante el bloqueo con 200 μ L de BSA al 5% en NaHCO₃ 0,1 M a temperatura ambiente (RT) durante 1 hora. El M13 clónico se diluyó 1:60 en TBS y se añadió a razón de 100 μ L/pozo, y los pozos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces con TBST. Se añadieron a cada pozo partes alícuotas de 100 μ L de anti-M13-HRP, diluidas 1:5.000 en TBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces, se añadió TMB y las placas se leyeron a 450 nm. Los pozos de control no contenían el anticuerpo NEO-101. Los resultados del ELISA de unión a M13 clonal se muestran en la Figura 7, que indica que 6 fagos M13 clonales se unen a los pozos recubiertos con NPC-1C, no el control de BSA bloqueado, lo cual es significativo.

Los péptidos identificados en los experimentos de bioselección se usaron en inmunoensayos de unión competitiva usando antígenos de cáncer de colon. Brevemente, la preparación de antígeno (Ag de Colon) se derivó de muestras de cáncer de colon allogénico agrupadas de múltiples pacientes, que se obtuvo después de la operación. Las membranas celulares se aislaron del tumor y las proteínas de membrana solubles se prepararon mediante sonicación y cromatografía Sephadex G-200. Los antígenos asociados a tumores semipurificados se identificaron mediante pruebas *in vitro* e *in vivo* en cánceres de colon y controles para inmunorreactividades mediadas por células. Los antígenos asociados a tumores se detectaron en el intestino fetal y las membranas celulares y se localizaron en las membranas de las células tumorales. Usando electroforesis discontinua en gradiente en gel, se separaron y compararon de forma cruzada los antígenos asociados al tumor y el CEA. Se demostró que los antígenos asociados a tumores (Ag de Colon) eran distintos de CEA (Hollinshead et al., 177 *Science* 887 (1972).

Se incubaron partes alícuotas de 100 μ L/pozo de Colon Ag (3 μ g/mL en regulador CBS) en una placa de 96 pozos a 4°C durante la noche. Los pozos se lavaron tres veces con TBST (Tween al 0,05%). La unión no específica se inhibió mediante el bloqueo con 200 μ L de leche al 1% en TBS a temperatura ambiente durante 1 hora. Se mezclaron previamente alícuotas de 100 μ L/pozo de NEO-100-biotina y se añadió el péptido de prueba, y los pozos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron tres veces con TBST. Se añadieron a cada pozo partes alícuotas de 100 μ L de estreptavidina-HRP, diluidas 1:2000, y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Los pozos se lavaron luego tres veces, se añadió TMB y las placas se leyeron a 450 nm. Los pozos de control

contenían NEO-101-biotina en una dilución serial de dos veces. Los resultados del ELISA de unión a M13 clonal se muestran en las Figuras 8A-B. La Figura 8A demostró 5/9 fagos clonales de M13 en bloque de NPC-1C que se une significativamente a Colon Ag; El porcentaje de inhibición es superior al 60%. Los valores de OD de esta prueba ELISA competitiva se muestran en la Figura 8B.

5 Los clones M13 identificados por la bioselección también se sometieron a inmunoensayo utilizando perlas magnéticas. Se mezclaron partes alícuotas de 5 µL de fago M13 (10¹¹/10 µL) con 10 µL de perlas Dynal® acopladas a NEO-101 a temperatura ambiente durante 20 minutos en un rotador. Se agregaron células CFPAC1 (30 µL de 10⁶ células/mL) y se incubaron a 4°C durante 30 min. Se contaron las células roseteadas (8 perlas/célula). Los resultados se muestran en la Tabla 13. Los experimentos mostraron que los clones 4-1-2-C5, 4-1-3-C8, 4-1-3-C9, 4-1-4-C11 y 4-1-4-C12
10 bloqueó las perlas acopladas a NEO-101 a partir de la unión a las células CFPAC1.

Tabla 13. Enlace de clones M13 a perlas acopladas al anticuerpo NEO-101.

Perlas Dynal acopladas con:	Clon M13	Células roseta positivas (%)
H-IgG	TBS	1
NEO-101	TBS	41
H16C3	TBS	60
NEO-101	4-1-2-C5	0
NEO-101	4-1-3-C8	0
NEO-101	4-1-3-C9	0
NEO-101	4-1-3-C11	38
NEO-101	4-1-4-C11	0
NEO-101	4-1-4-C12	0
NEO-101	4-1-4-C11 + 4-1-2-C5	0
H16C3	4-1-4-C11	36
H16C3	4-1-4-C11 + 4-1-2-C5	59

En otro experimento, los pozos se recubrieron con 100 µL/pozo de Colon Ag (3 µg/mL en regulador CBS) y se incubaron a 4°C durante la noche, y los pozos se lavaron tres veces con TBST (Tween al 0,05%). Los pozos se
15 bloquearon con 200 µL de leche al 1% a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una premezcla de NEO-101-biotina y fagos M13 clonales a 100 µL/pozo y se incubó a temperatura ambiente de 1 h, seguido de tres lavados con TBST. Se añadió estreptavidina-HRP (100 µL de dilución 1:2000) y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, y los pozos se lavaron tres veces. Se añadió TMB, y los pozos se leyeron a 450 nm. Los resultados de los fagos M13 clonales que bloquean la unión de NPC-1C a colon Ag se muestran en las Figuras 9A y 9B, que
20 demostraron la inhibición dependiente de los fagos M13 clonales en la unión de NPC-1C a Colon Ag en experimentos separados.

Se identificaron varios clones por *bioselección* y los inmunoensayos posteriores. A partir de este trabajo, se seleccionaron cuatro clones (y un control) para sintetizar péptidos para una caracterización adicional como se muestra en la Tabla 14. Las secuencias nativas de M13 son las YSHS (SEQ ID NO: 25) en el extremo terminal N del péptido, y la GGGS (SEQ ID NO: 26) en el extremo terminal C del péptido.
25

Tabla 14. Péptidos de unión a NEO-101 identificados en bioselección e inmunoensayos

ID de péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
4-13-C9	YSHSFPEDYFRYTNQKGGGS	19
4-1-4-C12	YSHSSLPDDWFRYINYGGGS	20
4-1-2-C5	YSHSWHTLPEKSLDENGGS	21
4-1-3-C8	YSHSWHTLPESGEVTSGGS	22

4-1-3-C11 (péptido de control)	YSHSVHAIEDNWSRGGGGS	23
--------------------------------	---------------------	----

La unión del péptido se analizó en ELISA añadiendo 100 µL/pozo del péptido en regulador CBS a una placa de 96 pozos e incubando a 4°C durante la noche, seguido de tres lavados con TBST (Tween al 0,05%). La solución se bloqueó con 200 µL de leche al 1% en TBS a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadieron partes alícuotas de 100 µL de NEO-101-biotina (1 µg/mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas, seguido de tres lavados con TBST. Se añadió estreptavidina-HRP (100 µL de 1:2000 diluido en regulador de bloqueo diluido 1:10), y los pozos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados. Luego se añadió TMB, y los pozos se leyeron a 450 nm. Controles utilizados en pozos recubiertos con 4B6. Los resultados de la unión del péptido a NEO-101 se muestran en la Figura 10, lo que indica que los péptidos no se unieron adecuadamente a la placa de ELISA.

Para resolver la unión deficiente de los péptidos a la placa de 96 pozos, los péptidos se biotinilaron utilizando el kit de biotinilación de micro NHS EZ-link (Pierce Cat # 21955) y se verificó la eficacia del marcaje mediante transferencia de puntos (50%). La unión del péptido biotinilado se analizó en ELISA agregando 100 µL/pozo de NEO-101 (1 µg/mL) en regulador CBS a una placa de 96 pozos e incubando a 4°C durante la noche, seguido de tres lavados con TBST (Tween al 0,05%). La solución se bloqueó con 200 µL de leche al 1% en TBS a temperatura ambiente durante 20 min. Se añadieron partes alícuotas de 100 µL del péptido-biotina (1 µg/mL) en leche 0,1%-TBS, y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 h, seguido de tres lavados con TBST. Se añadió estreptavidina-HRP (100 µL de 1:2000 diluido en regulador de bloqueo diluido 1:10), y los pozos se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados. Luego se añadió TMB, y los pozos se leyeron a 450 nm. Los controles positivos para la unión de NPC-1C utilizaron 4B6-biotina. Los resultados se muestran en la Figura 11, que indica que los péptidos biotinilados se unen a la placa recubierta con NPC-1C.

Se llevó a cabo un análisis ELISA de la inhibición de la unión a NEO-101 por el péptido 4-1-3-C9 y 4-1-4-C12 contra Colon Ag. Se incubaron partes alícuotas de 100 µL/pozo de Colon Ag (3 µg/mL en regulador CBS) en una placa de 96 pozos a 4°C durante la noche, y los pozos se lavaron tres veces con TBST (Tween al 0,05%). Los pozos se bloquearon con 200 µL de leche al 1% a temperatura ambiente durante 1 hora. Se añadió una premezcla de NEO-101-biotina y péptido de prueba a 100 µL/pozo y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, seguido de tres lavados con TBST. Se añadió estreptavidina-HRP (100 µL de dilución 1:2000) y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora, y los pozos se lavaron tres veces. Se añadió TMB, y los pozos se leyeron a 450 nm. El control fue NEO-101-biotina. Véase la Figura 12. En la Tabla 15 se muestra un resumen de los datos:

Tabla 15. Datos del inmunoensayo de péptidos sintéticos.

ID del péptido	Aminoácido	Unión de NEO-101	Bloqueo de la unión del anticuerpo NEO-101 a colon Ag	SEQ ID NO
4-1-3-C9	YSHSFPEDYFRYTNQKGGGS	Sí	Sí	19
4-1-4-C12	YSHSSLPDDWFRYINYGGGS	Sí	Sí	20
4-1-3-C8	YSHSWHTLPESGEVTSGGGS	Sí	No	22
4-1-3-C11	YSHSVHAIEDNWSRGGGGS	No	No (control negativo)	23
Se sintetizaron dos péptidos adicionales para confirmación:				
4-1-4-C12-biotina	YSHSSLPDDWFRYINYGGGS-Biotina			20
4-1-4C12-R2 (repetición de 12 mer)	SLPDDWFRYINYSLPDDWFRYINY			24

Los péptidos así identificados se compararon con la secuencia de MUC5AC, por ejemplo ID del Gen: 4586 (*Homo sapiens*), y los resultados se muestran en la Figura 13. Entre estos tres péptidos, los aminoácidos compartidos están subrayados de la siguiente manera:

TABLA 16: Comparación de tres peptidomiméticos

ID del péptido	Secuencia de aminoácidos	SEQ ID NO
4-1-3-C9	YSHSFP <u>EDYFRYTN</u> QKGGGS	19
4-1-4-C12	YSHSSLP <u>DDWFRYIN</u> YGGGS	20

4-1-4C12-R2	SLPDDWFRYINYSLPDDWFRYINY	24
-------------	--------------------------	----

5 Sobre esta base, se concluyó que los siguientes peptidomiméticos son péptidos de unión a anticuerpo que se unen a NEO-101: SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵ (SEQ ID NO: 1) en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y; SX¹PX²DX³FRYX⁴NX⁵K (SEQ ID NO: 2) en la que X¹ es para L; X² es E o D; X³ es Y o W; X⁴ es T o I y X⁵ es Q o Y y SLEPEX¹DWX²FRYX³NY (SEQ ID NO: 3) en la que X¹ es E o D; X² es W o Y; y X³ es T o I. Los ejemplos de peptidomiméticos incluyen pero no se limitan a FPEDYFRYTNQK (SEQ ID NO: 4) y SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5) y se describen peptidomiméticos adicionales en las SEQ ID NOs: 6-24.

10 A continuación, se investigó la inhibición de perlas de NEO-101 que se unen a las células CFAC1 (células roseta) por los péptidos 4-1-4C12 y 4-1-4C12-R2, como se muestra en la Figura 14A. La Figura 14B fue el resultado del control positivo con 4B6 en el ensayo competitivo de perlas. Como una alternativa a la observación de células roseta, el sobrenadante de las células cultivadas con CFAC1 se usó para recubrir placas ELISA, y se realizaron una serie de ensayos de competición como se muestra en la Figura 15A-B. Tanto el péptido 4-1-3C9 como el 4-1-4C12-R2 mostraron una competencia significativa contra el antígeno de CFPAC1 unido con la unión a NEO-101, y el péptido 4-1-4C12 mostró una mayor inhibición en baja concentración en comparación con 4-1-3C9.

15 Por lo tanto, el péptido 4-1-4C12 es un peptidomimético del epítipo NPC-1 y se puede usar para provocar anticuerpos específicos para NPC-1.

Ejemplo 12

El peptidomimético 4-1-4C12 conjugado con KLH es inmunogénico

20 Un ejemplo de peptidomimético del antígeno NPC-1, 4-1-4C12 (SEQ ID NO: 5) se conjugó con KLH (hemocianina de la lapa californiana) ("4-1-4-C12-KLH"). El conjugado peptidomimético-KLH, 4-1-4-C12-KLH, se une al anticuerpo NEO-101 como se muestra en los ensayos de ELISA. Además, 4-1-4C12-KLH bloquea la unión de NPC-1 al antígeno NPC-1C específicamente en ELISA de competición. Después de confirmar la función de 4-1-4C12-KLH, se inyectó 4-1-4C12-KLH en conejos. El suero inmunizado después de la tercera inyección se probó mediante ELISA de unión para verificar la función del anticuerpo inducido por 4-1-4C12-KLH. La placa se recubrió con péptido 4-1-4C12 o sobrenadante de CFPAC1, se añadió suero diluido al lavado y se bloqueó la placa. La IgG de conejo unida se detectó mediante IgG-HRP anti conejo de asno. El suero inmunizado con 4-1-4C12-KLH se une a 4-1-4C12 (SEQ ID NO: 5), pero también se une al sobrenadante de la línea celular pancreática humana CFPAC1 de una manera dependiente de la dosis. Figura 16A-B. Esto demuestra que el peptidomimético del epítipo NPC-1 se puede inyectar en un animal y provocar una respuesta inmune específica del epítipo NPC-1.

30 Se obtuvo IgG de conejo purificado (pAb anti 4-1-4C12) de conejo inmunizado para la prueba de confirmación. La placa se recubrió con antígeno NPC-1C (CFPAC1 o BSM), péptido 4-1-4C12 como control. Se añadió pAb anti-4-1-4C12 a la placa lavada y bloqueada. Se usó IgG-HRP anti-conejo de asno para detectar el anticuerpo de conejo unido. Los resultados mostraron que el pAb anti 4-1-4C12 se une al sobrenadante de la línea celular pancreática humana CFPAC1, BSM y péptido 4-1-4C12 de forma dependiente de la dosis. Figura 17. El pAb anti 4-1-4C12 tiene una afinidad más baja por BSM cuando se compara con anticuerpo NPC-1C en ELISA de unión. Figura 18.

40 Por lo tanto, los peptidomiméticos de NPC-1 descritos en el presente documento pueden conjugarse con vehículos (por ejemplo, KLH) y conservar su antigenicidad y provocar una respuesta inmune que incluye anticuerpos que se unen al epítipo NPC-1. Esta respuesta inmunitaria puede entonces ser activa en la eliminación (por ejemplo, lisis) de las células tumorales que expresan NPC-1 y, por lo tanto, tener un efecto terapéutico en el animal (por ejemplo, reducir el crecimiento del tumor, reducir el tamaño de los tumores).

Listado de secuencias

<110> NEOGENIX ONCOLOGY, INC.

Wang, XuePing

<120> Peptidomiméticos de cáncer de colon y páncreas

45 <130> 77685.008202

<140> No asignado

<141> 2011-09-23

<150> 61/385.587

<151> 2010-09-23

<150> 61/407.112
 <151> 2010-10-27
 <150> 61/435.163
 <151> 2011-01-21
 5 <150> 61/435.176
 <151> 2011-01-21
 <150> 61/467.896
 <151> 2011-03-25
 <150> PCT/US2011/41502
 10 <151> 2011-06-22
 <160> 89
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 12
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Peptidomimético de NPC-1
 <220>
 20 <221> VARIANTE
 <222> (2)..(2)
 <223> Xaa puede ser Leu
 <220>
 <221> VARIANTE
 25 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa puede ser Glu o Asp
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (6)..(6)
 30 <223> Xaa puede ser Tyr o Trp
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser Thr o Ile
 35 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (12)..(12)

ES 2 719 624 T3

<223> Xaa puede ser Gln o Tyr

<400> 1

Ser Xaa Pro Xaa Asp Xaa Phe Arg Tyr Xaa Asn Xaa
1 5 10

<210> 2

5 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser Leu

<220>

15 <221> VARIANTE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>

<221> VARIANTE

20 <222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Tyr o Trp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

25 <223> Xaa puede ser Thr o Ile

<220>

<221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser Gln o Tyr

30 <400> 2

Ser Xaa Pro Xaa Asp Xaa Phe Arg Tyr Xaa Asn Xaa Lys
1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

ES 2 719 624 T3

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (6)..(6)

<223> Xaa puede ser Glu o Asp

<220>

<221> VARIANTE

<222> (9)..(9)

10 <223> Xaa puede ser Trp o Tyr

<220>

<221> VARIANTE

<222> (13)..(13)

<223> Xaa puede ser Thr o Ile

15 <400> 3

	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Xaa	Asp	Trp	Xaa	Phe	Arg	Tyr	Xaa	Asn	Tyr
	1				5					10					15

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 4

	Phe	Pro	Glu	Asp	Tyr	Phe	Arg	Tyr	Thr	Asn	Gln	Lys
	1				5					10		

25 <210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 5

	Ser	Leu	Pro	Asp	Asp	Trp	Phe	Arg	Tyr	Ile	Asn	Tyr
	1				5					10		

<210> 6

<211> 12

35 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<220>

5 <221> VARIANTE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

<400> 6

Ser Phe Pro Val Asn Cys Cys Arg Tyr Lys Lys Xaa

10 1 5 10

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 7

Ser Phe Pro Val Asn Cys Cys Arg Tyr Lys Lys

1 5 10

<210> 8

20 <211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

25 <400> 8

Phe Leu Glu Val Tyr Ile Arg Lys Val Ile Arg Arg Val Glu Val Gln
1 5 10 15

Arg Asn Phe Asp Arg Cys Leu Ala Glu Ser His Thr Arg
20 25

<210> 9

<211> 20

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 9

ES 2 719 624 T3

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu Asn Ser
 1 5 10 15

Phe Thr Asn Val
 20

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<400> 10

Ala Glu Thr Val Glu Ser Cys Leu Ala Lys Ser His Thr Glu Asn Ser
 1 5 10 15

<210> 11

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 11

15 Trp His Thr Leu Pro Glu Lys Ser Leu Asp Glu Asn
 1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 12

Trp His Thr Leu Pro Glu Ser Gly Glu Val Thr Ser
 1 5 10

<210> 13

25 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

30 <400> 13

Glu Tyr Gly Leu Gln Gln Gly Thr Pro Asn Ser Lys
 1 5 10

ES 2 719 624 T3

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 14

Phe	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Arg	Thr	Pro	Ala	Ala	Thr
1				5					10		

<210> 15

10 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

15 <400> 15

Val	His	Ala	Ile	Glu	Asp	Asn	Trp	Ser	Pro	Arg	Gly
1				5					10		

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 16

Glu	Ala	Ser	Lys	Ser	Ser	His	Thr	Leu	Trp	Thr	Asp
1				5					10		

25 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 17

Ser	Gln	Lys	Pro	Thr	His	Ile	Gln	Lys	Ala	Leu	Ser
1				5					10		

<210> 18

<211> 12

ES 2 719 624 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

5 <400> 18

Phe Asn Asp Gly Gly Ala Leu Ser Ser Leu Arg Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 20

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 19

Tyr Ser His Ser Phe Pro Glu Asp Tyr Phe Arg Tyr Thr Asn Gln Lys
1 5 10 15

15 Gly Gly Gly Ser
20

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 20

Tyr Ser His Ser Ser Leu Pro Asp Asp Trp Phe Arg Tyr Ile Asn Tyr
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 21

25 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

30 <400> 21

ES 2 719 624 T3

Tyr Ser His Ser Trp His Thr Leu Pro Glu Lys Ser Leu Asp Glu Asn
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 22

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 22

Tyr Ser His Ser Trp His Thr Leu Pro Glu Ser Gly Glu Val Thr Ser
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

10 <210> 23

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 23

Tyr Ser His Ser Val His Ala Ile Glu Asp Asn Trp Ser Pro Arg Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
20

<210> 24

<211> 24

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Peptidomimético del epítipo NPC-1

<400> 24

Ser Leu Pro Asp Asp Trp Phe Arg Tyr Ile Asn Tyr Ser Leu Pro Asp
1 5 10 15

Asp Trp Phe Arg Tyr Ile Asn Tyr
20

25

ES 2 719 624 T3

<210> 25
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Secuencia del extremo terminal N M13
 <400> 25

Tyr Ser His Ser
1

<210> 26
 10 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Secuencia del extremo terminal C M13
 15 <400> 26

Gly Gly Gly Ser
1

<210> 27
 <211> 45
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Fragmento de termolisina MUC5AC
 <400> 27

	Leu	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser
	1				5					10						15

	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser
					20				25					30		

	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Ser
			35					40					45

25 <210> 28
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> Fragmento de termolisina MUC5AC

ES 2 719 624 T3

<400> 28

Ser Ser Pro Thr Thr Ser Thr Thr Pro Thr Pro Gln Thr Ser Thr Thr
1 5 10 15

Ser Ser Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr
20 25 30

Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser
35 40 45

<210> 29

<211> 59

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de termolisina MUC5AC

<400> 29

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

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser
20 25 30

10

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Thr Ser Ser
35 40 45

Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser Thr Thr Ser
50 55

<210> 30

<211> 54

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de termolisina MUC5AC

<400> 30

ES 2 719 624 T3

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

Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
20 25 30

Thr Pro Gln Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser
35 40 45

Ala Pro Thr Thr Ser Thr
50

<210> 31

<211> 45

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento de termolisina MUC5AC

<400> 31

Met Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser
1 5 10 15

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr
20 25 30

Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
35 40 45

10 <210> 32

<211> 54

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Fragmento de termolisina MUC5AC

<400> 32

Ile Thr Ser Met Pro Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro

ES 2 719 624 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Epítipo NPC-1 de MUC5AC identificado por estudios de eliminación

<400> 35

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

<210> 36

<211> 5030

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10 <400> 36

ES 2 719 624 T3

Met Ser Val Gly Arg Arg Lys Leu Ala Leu Leu Trp Ala Leu Ala Leu
 1 5 10 15

Ala Leu Ala Cys Thr Arg His Thr Gly His Ala Gln Asp Gly Ser Ser
 20 25 30

Glu Ser Ser Tyr Lys His His Pro Ala Leu Ser Pro Ile Ala Arg Gly
 35 40 45

Pro Ser Gly Val Pro Leu Arg Gly Ala Thr Val Phe Pro Ser Leu Arg
 50 55 60

Thr Ile Pro Val Val Arg Ala Ser Asn Pro Ala His Asn Gly Arg Val
 65 70 75 80

Cys Ser Thr Trp Gly Ser Phe His Tyr Lys Thr Phe Asp Gly Asp Val
 85 90 95

Phe Arg Phe Pro Gly Leu Cys Asn Tyr Val Phe Ser Glu His Cys Gly
 100 105 110

Ala Ala Tyr Glu Asp Phe Asn Ile Gln Leu Arg Arg Ser Gln Glu Ser
 115 120 125

Ala Ala Pro Thr Leu Ser Arg Val Leu Met Lys Val Asp Gly Val Val
 130 135 140

Ile Gln Leu Thr Lys Gly Ser Val Leu Val Asn Gly His Pro Val Leu
 145 150 155 160

Leu Pro Phe Ser Gln Ser Gly Val Leu Ile Gln Gln Ser Ser Ser Tyr
 165 170 175

Thr Lys Val Glu Ala Arg Leu Gly Leu Val Leu Met Trp Asn His Asp
 180 185 190

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

ES 2 719 624 T3

Gly Leu Cys Gly Asp Phe Asn Gly Met Pro Val Val Ser Glu Leu Leu
 210 215 220
 Ser His Asn Thr Lys Leu Thr Pro Met Glu Phe Gly Asn Leu Gln Lys
 225 230 235 240
 Met Asp Asp Pro Thr Glu Gln Cys Gln Asp Pro Val Pro Glu Pro Pro
 245 250 255
 Arg Asn Cys Ser Thr Gly Phe Gly Ile Cys Glu Glu Leu Leu His Gly
 260 265 270
 Gln Leu Phe Ser Gly Cys Val Ala Leu Val Asp Val Gly Ser Tyr Leu
 275 280 285
 Glu Ala Cys Arg Gln Asp Leu Cys Phe Cys Glu Asp Thr Asp Leu Leu
 290 295 300
 Ser Cys Val Cys His Thr Leu Ala Glu Tyr Ser Arg Gln Cys Thr His
 305 310 315 320
 Ala Gly Gly Leu Pro Gln Asp Trp Arg Gly Pro Asp Phe Cys Pro Gln
 325 330 335
 Lys Cys Pro Asn Asn Met Gln Tyr His Glu Cys Arg Ser Pro Cys Ala
 340 345 350
 Asp Thr Cys Ser Asn Gln Glu His Ser Arg Ala Cys Glu Asp His Cys
 355 360 365
 Val Ala Gly Cys Phe Cys Pro Glu Gly Thr Val Leu Asp Asp Ile Gly
 370 375 380
 Gln Thr Gly Cys Val Pro Val Ser Lys Cys Ala Cys Val Tyr Asn Gly
 385 390 395 400
 Ala Ala Tyr Ala Pro Gly Ala Thr Tyr Ser Thr Asp Cys Thr Asn Cys
 405 410 415
 Thr Cys Ser Gly Gly Arg Trp Ser Cys Gln Glu Val Pro Cys Pro Asp
 420 425 430
 Thr Cys Ser Val Leu Gly Gly Ala His Phe Ser Thr Phe Asp Gly Lys
 435 440 445
 Gln Tyr Thr Val His Gly Asp Cys Ser Tyr Val Leu Thr Lys Pro Cys

ES 2 719 624 T3

450 455 460
 Asp Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Ala Glu Leu Arg Arg Cys Gly Leu
 465 470 475 480
 Thr Asp Ser Glu Thr Cys Leu Lys Ser Val Thr Leu Ser Leu Asp Gly
 485 490 495
 Ala Gln Thr Val Val Val Ile Lys Ala Ser Gly Glu Val Phe Leu Asn
 500 505 510
 Gln Ile Tyr Thr Gln Leu Pro Ile Ser Ala Ala Asn Val Thr Ile Phe
 515 520 525
 Arg Pro Ser Thr Phe Phe Ile Ile Ala Gln Thr Ser Leu Gly Leu Gln
 530 535 540
 Leu Asn Leu Gln Pro Val Pro Thr Met Gln Leu Phe Met Gln Leu Ala
 545 550 555 560
 Pro Lys Leu Arg Gly Gln Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ser
 565 570 575
 Ile Gln Ala Asp Asp Phe Arg Thr Leu Ser Gly Val Val Glu Ala Thr
 580 585 590
 Ala Ala Ala Phe Phe Asn Thr Phe Lys Thr Gln Ala Ala Cys Pro Asn
 595 600 605
 Ile Arg Asn Ser Phe Glu Asp Pro Cys Ser Leu Ser Val Glu Asn Glu
 610 615 620
 Lys Tyr Ala Gln His Trp Cys Ser Gln Leu Thr Asp Ala Asp Gly Pro
 625 630 635 640
 Phe Gly Arg Cys His Ala Ala Val Lys Pro Gly Thr Tyr Tyr Ser Asn
 645 650 655
 Cys Val Phe Asp Thr Cys Asn Cys Glu Arg Ser Glu Asp Cys Leu Cys
 660 665 670
 Ala Ala Leu Ser Ser Tyr Val His Ala Cys Ala Ala Lys Gly Val Gln
 675 680 685
 Leu Gly Gly Trp Arg Asp Gly Val Cys Thr Lys Pro Met Thr Thr Cys
 690 695 700

ES 2 719 624 T3

Pro Lys Ser Met Thr Tyr His Tyr His Val Ser Thr Cys Gln Pro Thr
 705 710 715 720
 Cys Arg Ser Leu Ser Glu Gly Asp Ile Thr Cys Ser Val Gly Phe Ile
 725 730 735
 Pro Val Asp Gly Cys Ile Cys Pro Lys Gly Thr Phe Leu Asp Asp Thr
 740 745 750
 Gly Lys Cys Val Gln Ala Ser Asn Cys Pro Cys Tyr His Arg Gly Ser
 755 760 765
 Met Ile Pro Asn Gly Glu Ser Val His Asp Ser Gly Ala Ile Cys Thr
 770 775 780
 Cys Thr His Gly Lys Leu Ser Cys Ile Gly Gly Gln Ala Pro Ala Pro
 785 790 795 800
 Val Cys Ala Ala Pro Met Val Phe Phe Asp Cys Arg Asn Ala Thr Pro
 805 810 815
 Gly Asp Thr Gly Ala Gly Cys Gln Lys Ser Cys His Thr Leu Asp Met
 820 825 830
 Thr Cys Tyr Ser Pro Gln Cys Val Pro Gly Cys Val Cys Pro Asp Gly
 835 840 845
 Leu Val Ala Asp Gly Glu Gly Gly Cys Ile Thr Ala Glu Asp Cys Pro
 850 855 860
 Cys Val His Asn Glu Ala Ser Tyr Arg Ala Gly Gln Thr Ile Arg Val
 865 870 875 880
 Gly Cys Asn Thr Cys Thr Cys Asp Ser Arg Met Trp Arg Cys Thr Asp
 885 890 895
 Asp Pro Cys Leu Ala Thr Cys Ala Val Tyr Gly Asp Gly His Tyr Leu
 900 905 910
 Thr Phe Asp Gly Gln Ser Tyr Ser Phe Asn Gly Asp Cys Glu Tyr Thr
 915 920 925
 Leu Val Gln Asn His Cys Gly Gly Lys Asp Ser Thr Gln Asp Ser Phe
 930 935 940
 Arg Val Val Thr Glu Asn Val Pro Cys Gly Thr Thr Gly Thr Thr Cys
 945 950 955 960

ES 2 719 624 T3

Ser Lys Ala Ile Lys Ile Phe Leu Gly Gly Phe Glu Leu Lys Leu Ser
 965 970 975

His Gly Lys Val Glu Val Ile Gly Thr Asp Glu Ser Gln Glu Val Pro
 980 985 990

Tyr Thr Ile Gln Gln Met Gly Ile Tyr Leu Val Val Asp Thr Asp Ile
 995 1000 1005

Gly Leu Val Leu Leu Trp Asp Lys Lys Thr Ser Ile Phe Ile Asn
 1010 1015 1020

Leu Ser Pro Glu Phe Lys Gly Arg Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn
 1025 1030 1035

Phe Asp Asp Ile Ala Val Asn Asp Phe Ala Thr Arg Ser Arg Ser
 1040 1045 1050

Val Val Gly Asp Val Leu Glu Phe Gly Asn Ser Trp Lys Leu Ser
 1055 1060 1065

Pro Ser Cys Pro Asp Ala Leu Ala Pro Lys Asp Pro Cys Thr Ala
 1070 1075 1080

Asn Pro Phe Arg Lys Ser Trp Ala Gln Lys Gln Cys Ser Ile Leu
 1085 1090 1095

His Gly Pro Thr Phe Ala Ala Cys His Ala His Val Glu Pro Ala
 1100 1105 1110

Arg Tyr Tyr Glu Ala Cys Val Asn Asp Ala Cys Ala Cys Asp Ser
 1115 1120 1125

Gly Gly Asp Cys Glu Cys Phe Cys Thr Ala Val Ala Ala Tyr Ala
 1130 1135 1140

Gln Ala Cys His Glu Val Gly Leu Cys Val Cys Leu Arg Thr Pro
 1145 1150 1155

Ser Ile Cys Pro Leu Phe Cys Asp Tyr Tyr Asn Pro Glu Gly Gln
 1160 1165 1170

Cys Glu Trp His Tyr Gln Pro Cys Gly Val Pro Cys Leu Arg Thr
 1175 1180 1185

Cys Arg Asn Pro Arg Gly Asp Cys Leu Arg Asp Val Arg Gly Leu
 1190 1195 1200

ES 2 719 624 T3

Glu Gly Cys Tyr Pro Lys Cys Pro Pro Glu Ala Pro Ile Phe Asp
 1205 1210 1215
 Glu Asp Lys Met Gln Cys Val Ala Thr Cys Pro Thr Pro Pro Leu
 1220 1225 1230
 Pro Pro Arg Cys His Val His Gly Lys Ser Tyr Arg Pro Gly Ala
 1235 1240 1245
 Val Val Pro Ser Asp Lys Asn Cys Gln Ser Cys Leu Cys Thr Glu
 1250 1255 1260
 Arg Gly Val Glu Cys Thr Tyr Lys Ala Glu Ala Cys Val Cys Thr
 1265 1270 1275
 Tyr Asn Gly Gln Arg Phe His Pro Gly Asp Val Ile Tyr His Thr
 1280 1285 1290
 Thr Asp Gly Thr Gly Gly Cys Ile Ser Ala Arg Cys Gly Ala Asn
 1295 1300 1305
 Gly Thr Ile Glu Arg Arg Val Tyr Pro Cys Ser Pro Thr Thr Pro
 1310 1315 1320
 Val Pro Pro Thr Thr Phe Ser Phe Ser Thr Pro Pro Leu Val Val
 1325 1330 1335
 Ser Ser Thr His Thr Pro Ser Asn Gly Pro Ser Ser Ala His Thr
 1340 1345 1350
 Gly Pro Pro Ser Ser Ala Trp Pro Thr Thr Ala Gly Thr Ser Pro
 1355 1360 1365
 Arg Thr Arg Leu Pro Thr Ala Ser Ala Ser Leu Pro Pro Val Cys
 1370 1375 1380
 Gly Glu Lys Cys Leu Trp Ser Pro Trp Met Asp Val Ser Arg Pro
 1385 1390 1395
 Gly Arg Gly Thr Asp Ser Gly Asp Phe Asp Thr Leu Glu Asn Leu
 1400 1405 1410
 Arg Ala His Gly Tyr Arg Val Cys Glu Ser Pro Arg Ser Val Glu
 1415 1420 1425
 Cys Arg Ala Glu Asp Ala Pro Gly Val Pro Leu Arg Ala Leu Gly

ES 2 719 624 T3

Gln Cys Cys Glu Thr Val Asn Val Cys Arg Asp Ile Thr Arg Leu
 1670 1675 1680

Pro Lys Thr Val Ala Thr Thr Arg Pro Thr Pro His Pro Thr Gly
 1685 1690 1695

Ala Gln Thr Gln Thr Thr Phe Thr Thr His Met Pro Ser Ala Ser
 1700 1705 1710

Thr Glu Gln Pro Thr Ala Thr Ser Arg Gly Gly Pro Thr Ala Thr
 1715 1720 1725

Ser Val Thr Gln Gly Thr His Thr Thr Leu Val Thr Arg Asn Cys
 1730 1735 1740

His Pro Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro
 1745 1750 1755

Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
 1760 1765 1770

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr
 1775 1780 1785

Arg Val Gln Cys Arg Ala Lys Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu
 1790 1795 1800

His Leu Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val
 1805 1810 1815

Cys Arg Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn
 1820 1825 1830

Tyr Glu Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Arg Gly Cys His
 1835 1840 1845

Met Thr Ser Thr Pro Gly Ser Thr Ser Ser Ser Pro Ala Gln Thr
 1850 1855 1860

Thr Pro Ser Thr Thr Ser Lys Thr Thr Glu Ile Gln Ala Ser Gly
 1865 1870 1875

Ser Ser Ala Pro Ser Ser Thr Pro Gly Thr Val Ser Leu Ser Thr
 1880 1885 1890

Ala Arg Thr Thr Pro Ala Pro Gly Thr Ala Thr Ser Val Lys Lys
 1895 1900 1905

ES 2 719 624 T3

Thr Phe Ser Thr Pro Ser Pro Pro Pro Val Pro Ala Thr Ser Thr
 1910 1915 1920

Ser Ser Met Ser Thr Thr Ala Pro Gly Thr Ser Val Val Ser Ser
 1925 1930 1935

Lys Pro Thr Pro Thr Glu Pro Ser Thr Ser Ser Cys Leu Gln Glu
 1940 1945 1950

Leu Cys Thr Trp Thr Glu Trp Ile Asp Gly Ser Tyr Pro Ala Pro
 1955 1960 1965

Gly Ile Asn Gly Gly Asp Phe Asp Thr Phe Gln Asn Leu Arg Asp
 1970 1975 1980

Glu Gly Tyr Thr Phe Cys Glu Ser Pro Arg Ser Val Gln Cys Arg
 1985 1990 1995

Ala Glu Ser Phe Pro Asn Thr Pro Leu Gly Arg Leu Gly Gln Asp
 2000 2005 2010

Val Ile Cys Ser His Thr Glu Gly Leu Ile Cys Leu Asn Lys Asn
 2015 2020 2025

Gln Leu Pro Pro Ile Cys Tyr Asn Tyr Glu Ile Arg Ile Gln Cys
 2030 2035 2040

Cys Glu Thr Val Asn Val Cys Arg Asp Ile Thr Arg Pro Pro Lys
 2045 2050 2055

Thr Val Ala Thr Thr Arg Pro Thr Pro His Pro Thr Gly Ala Gln
 2060 2065 2070

Thr Gln Thr Thr Phe Thr Thr His Met Pro Ser Ala Ser Thr Glu
 2075 2080 2085

Gln Pro Thr Ala Thr Ser Arg Gly Gly Pro Thr Ala Thr Ser Val
 2090 2095 2100

Thr Gln Gly Thr His Thr Thr Pro Val Thr Arg Asn Cys His Pro
 2105 2110 2115

Arg Cys Thr Trp Thr Thr Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro Ser Pro
 2120 2125 2130

Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile Ile Arg
 2135 2140 2145

ES 2 719 624 T3

Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg Leu
 2150 2155 2160

Gln Cys Arg Ala Lys Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
 2165 2170 2175

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg
 2180 2185 2190

Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Ile Glu
 2195 2200 2205

Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys Pro Val Thr
 2210 2215 2220

Ser Thr Pro Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro Ser Gly Arg Ala Ile
 2225 2230 2235

Ser Pro Thr Gln Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys Ser Arg Thr Thr
 2240 2245 2250

Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser Thr
 2255 2260 2265

Thr Tyr Ala His Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ala Arg
 2270 2275 2280

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Val Pro Thr Thr
 2285 2290 2295

Ser Thr Ile Ser Gly Pro Lys Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr
 2300 2305 2310

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Ala Thr Thr Ser Thr Ile Ser Ala Pro
 2315 2320 2325

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Val Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val
 2330 2335 2340

Leu Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Arg Thr Thr Ser
 2345 2350 2355

Ala Ser Pro Ala Gly Thr Thr Ser Gly Pro Gly Asn Thr Pro Ser
 2360 2365 2370

Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Ile

ES 2 719 624 T3

2375						2380						2385			
Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Ser	
2390						2395						2400			
Thr	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Thr	Thr	
2405						2410					2415				
Ser	Ile	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	
2420						2425					2430				
Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	
2435						2440					2445				
Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	
2450						2455					2460				
Pro	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	
2465						2470					2475				
Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Ile	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	
2480						2485					2490				
Pro	Val	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	
2495						2500					2505				
Thr	Ser	Ala	Ala	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	
2510						2515					2520				
Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	
2525						2530					2535				
Ser	Lys	Thr	Ser	Gly	Leu	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Ile	Pro	Thr	
2540						2545					2550				
Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Ser	
2555						2560					2565				
Thr	Ala	Ser	Lys	Thr	Ser	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	
2570						2575					2580				
Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	Phe	Ala	Pro	Arg	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	
2585						2590					2595				
Ala	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Pro	Gly	Pro	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	
2600						2605					2610				

ES 2 719 624 T3

Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Ala Ser Val Ser Lys Thr Ser Thr
 2615 2620 2625

Ser His Val Ser Ile Ser Lys Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr
 2630 2635 2640

Arg Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val
 2645 2650 2655

Asp Phe Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr
 2660 2665 2670

Asn Asn Ile Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu
 2675 2680 2685

Glu Ile Thr Arg Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val
 2690 2695 2700

Ser Ile Glu His Leu Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu
 2705 2710 2715

Gly Leu Val Cys Arg Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met
 2720 2725 2730

Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys
 2735 2740 2745

Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro
 2750 2755 2760

Ser Gly Arg Ala Thr Ser Pro Thr Gln Ser Thr Ser Ser Trp Gln
 2765 2770 2775

Lys Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr
 2780 2785 2790

Pro Gln Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
 2795 2800 2805

Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr
 2810 2815 2820

Ser Thr Pro Gln Thr Ser Ile Ser Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr
 2825 2830 2835

Thr Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Ile Ser Ala Arg Thr Thr Ser
 2840 2845 2850

ES 2 719 624 T3

Ile Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Thr Thr
 2855 2860 2865

Ser Thr Thr Ser Ala Thr Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr
 2870 2875 2880

Ser Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser Lys Thr Ser Ala Ala
 2885 2890 2895

Thr Ser Ser Thr Thr Ser Ser Ser Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val
 2900 2905 2910

Thr Thr Thr Ser Thr Ala Ser Val Ser Lys Thr Ser Thr Ser His
 2915 2920 2925

Val Ser Val Ser Lys Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg Asp
 2930 2935 2940

Cys His Pro Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
 2945 2950 2955

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn
 2960 2965 2970

Ile Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Gln Glu Ile
 2975 2980 2985

Thr Arg Leu Gln Cys Arg Ala Lys Ser His Pro Glu Val Ser Ile
 2990 2995 3000

Glu His Leu Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu
 3005 3010 3015

Val Cys Arg Asn Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu
 3020 3025 3030

Asn Tyr Glu Val Arg Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys
 3035 3040 3045

Pro Val Thr Ser Thr Ser Val Thr Ala Pro Ser Pro Leu Val Gly
 3050 3055 3060

Glu Pro Pro Ala Gln Thr Gln Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys Ser
 3065 3070 3075

Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Ser Ser Ile Thr Ser Thr Thr Gln
 3080 3085 3090

ES 2 719 624 T3

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Pro Ala Ser
 3095 3100 3105

Ile Pro Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala
 3110 3115 3120

Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
 3125 3130 3135

Thr Pro Gln Thr Thr Thr Ser Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr
 3140 3145 3150

Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr
 3155 3160 3165

Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ala Ser
 3170 3175 3180

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Ser Thr Ser Ser Ala Pro Thr Thr Asn
 3185 3190 3195

Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Ile Thr
 3200 3205 3210

Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln
 3215 3220 3225

Thr Ser Thr Ile Ser Ser Pro Thr Thr Ser Thr Thr Pro Thr Pro
 3230 3235 3240

Gln Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala
 3245 3250 3255

Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
 3260 3265 3270

Thr Pro Gln Thr Ser Ile Ser Ser Ala Pro Thr Ser Ser Thr Thr
 3275 3280 3285

Ser Ala Pro Thr Ala Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr
 3290 3295 3300

Thr Ser Phe His Thr Thr Ser Thr Thr Ser Pro Pro Thr Ser Ser
 3305 3310 3315

Thr Ser Ser Thr Pro Gln Thr Ser Lys Thr Ser Ala Ala Thr Ser

ES 2 719 624 T3

3320						3325						3330			
Ser	Thr	Thr	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Thr	Pro	Ser	Pro	Val	Pro	Thr	
3335						3340					3345				
Thr	Ser	Thr	Ala	Ser	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Ser	His	Val	Ser	
3350						3355					3360				
Val	Ser	Lys	Thr	Thr	His	Ser	Gln	Pro	Val	Thr	Arg	Asp	Cys	His	
3365						3370					3375				
Pro	Arg	Cys	Thr	Trp	Thr	Lys	Trp	Phe	Asp	Val	Asp	Phe	Pro	Ser	
3380						3385					3390				
Pro	Gly	Pro	His	Gly	Gly	Asp	Lys	Glu	Thr	Tyr	Asn	Asn	Ile	Ile	
3395						3400					3405				
Arg	Ser	Gly	Glu	Lys	Ile	Cys	Arg	Arg	Pro	Glu	Glu	Ile	Thr	Arg	
3410						3415					3420				
Leu	Gln	Cys	Arg	Ala	Glu	Ser	His	Pro	Glu	Val	Ser	Ile	Glu	His	
3425						3430					3435				
Leu	Gly	Gln	Val	Val	Gln	Cys	Ser	Arg	Glu	Glu	Gly	Leu	Val	Cys	
3440						3445					3450				
Arg	Asn	Gln	Asp	Gln	Gln	Gly	Pro	Phe	Lys	Met	Cys	Leu	Asn	Tyr	
3455						3460					3465				
Glu	Val	Arg	Val	Leu	Cys	Cys	Glu	Thr	Pro	Lys	Gly	Cys	Pro	Val	
3470						3475					3480				
Thr	Ser	Thr	Pro	Val	Thr	Ala	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Gly	Arg	Ala	
3485						3490					3495				
Thr	Ser	Pro	Thr	Gln	Ser	Thr	Ser	Ser	Trp	Gln	Lys	Ser	Arg	Thr	
3500						3505					3510				
Thr	Thr	Leu	Val	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Pro	Gln	Thr	Ser	
3515						3520					3525				
Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Ile	Pro	Ala	Ser	Thr	Pro	
3530						3535					3540				
Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	Thr	Ser	Thr	Thr	Ser	Ala	Pro	Thr	
3545						3550					3555				

ES 2 719 624 T3

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr His Arg Thr Thr Ser Gly Pro
 3560 3565 3570

Thr Thr Ser Thr Thr Leu Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala
 3575 3580 3585

Pro Thr Thr Ser Thr Asn Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Ile Ser
 3590 3595 3600

Ala Ser Thr Thr Ser Thr Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Ile
 3605 3610 3615

Ser Ser Pro Thr Ser Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser Lys
 3620 3625 3630

Thr Ser Ala Ala Thr Ser Ser Thr Thr Ser Gly Ser Gly Thr Thr
 3635 3640 3645

Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Ser Thr Thr
 3650 3655 3660

Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly
 3665 3670 3675

Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Ser Thr Ser Ile Thr Ser Ala Ala
 3680 3685 3690

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Arg Thr Thr Ser Ala
 3695 3700 3705

Pro Thr Ser Ser Met Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro
 3710 3715 3720

Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr
 3725 3730 3735

Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr
 3740 3745 3750

Thr Ser Ala Pro Ile Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Ser Thr
 3755 3760 3765

Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr
 3770 3775 3780

Ser Thr Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser Thr Thr Ser Gly Pro Thr
 3785 3790 3795

ES 2 719 624 T3

Thr Ser Thr Thr Ser Ala Ser Thr Thr Ser Thr Ile Ser Pro Leu
3800 3805 3810

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Ile Thr Ser Met Pro Ser Gly
3815 3820 3825

Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
3830 3835 3840

Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser
3845 3850 3855

Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr
3860 3865 3870

Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr
3875 3880 3885

Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr
3890 3895 3900

Ser Thr Thr Ser Ala Ser Thr Ala Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly
3905 3910 3915

Thr Ser Leu Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
3920 3925 3930

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val
3935 3940 3945

Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser
3950 3955 3960

Gly Pro Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Pro Thr Thr Ser Thr Thr
3965 3970 3975

Pro Val Ser Lys Thr Ser Thr Ser His Leu Ser Val Ser Lys Thr
3980 3985 3990

Thr His Ser Gln Pro Val Thr Ser Asp Cys His Pro Leu Cys Ala
3995 4000 4005

Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe Pro Ser Pro Gly Pro His
4010 4015 4020

Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile Ile Arg Ser Gly Glu
4025 4030 4035

ES 2 719 624 T3

Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg Leu Gln Cys Arg
 4040 4045 4050

Ala Glu Ser His Pro Glu Val Asn Ile Glu His Leu Gly Gln Val
 4055 4060 4065

Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn Gln Asp
 4070 4075 4080

Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg Val
 4085 4090 4095

Leu Cys Cys Glu Thr Pro Arg Gly Cys Pro Val Thr Ser Val Thr
 4100 4105 4110

Pro Tyr Gly Thr Ser Pro Thr Asn Ala Leu Tyr Pro Ser Leu Ser
 4115 4120 4125

Thr Ser Met Val Ser Ala Ser Val Ala Ser Thr Ser Val Ala Ser
 4130 4135 4140

Ser Ser Val Ala Ser Ser Ser Val Ala Tyr Ser Thr Gln Thr Cys
 4145 4150 4155

Phe Cys Asn Val Ala Asp Arg Leu Tyr Pro Ala Gly Ser Thr Ile
 4160 4165 4170

Tyr Arg His Arg Asp Leu Ala Gly His Cys Tyr Tyr Ala Leu Cys
 4175 4180 4185

Ser Gln Asp Cys Gln Val Val Arg Gly Val Asp Ser Asp Cys Pro
 4190 4195 4200

Ser Thr Thr Leu Pro Pro Ala Pro Ala Thr Ser Pro Ser Ile Ser
 4205 4210 4215

Thr Ser Glu Pro Val Thr Glu Leu Gly Cys Pro Asn Ala Val Pro
 4220 4225 4230

Pro Arg Lys Lys Gly Glu Thr Trp Ala Thr Pro Asn Cys Ser Glu
 4235 4240 4245

Ala Thr Cys Glu Gly Asn Asn Val Ile Ser Leu Ser Pro Arg Thr
 4250 4255 4260

Cys Pro Arg Val Glu Lys Pro Thr Cys Ala Asn Gly Tyr Pro Ala

ES 2 719 624 T3

4265						4270										4275
Val Lys	Val Ala	Asp Gln	Asp Gly	Cys Cys	His His	Tyr Gln	Cys									
4280			4285			4290										
Gln Cys	Val Cys	Ser Gly	Trp Gly	Asp Pro	His Tyr	Ile Thr	Phe									
4295			4300			4305										
Asp Gly	Thr Tyr	Tyr Thr	Phe Leu	Asp Asn	Cys Thr	Tyr Val	Leu									
4310			4315			4320										
Val Gln	Gln Ile	Val Pro	Val Tyr	Gly His	Phe Arg	Val Leu	Val									
4325			4330			4335										
Asp Asn	Tyr Phe	Cys Gly	Ala Glu	Asp Gly	Leu Ser	Cys Pro	Arg									
4340			4345			4350										
Ser Ile	Ile Leu	Glu Tyr	His Gln	Asp Arg	Val Val	Leu Thr	Arg									
4355			4360			4365										
Lys Pro	Val His	Gly Val	Met Thr	Asn Glu	Ile Ile	Phe Asn	Asn									
4370			4375			4380										
Lys Val	Val Ser	Pro Gly	Phe Arg	Lys Asn	Gly Ile	Val Val	Ser									
4385			4390			4395										
Arg Ile	Gly Val	Lys Met	Tyr Ala	Thr Ile	Pro Glu	Leu Gly	Val									
4400			4405			4410										
Gln Val	Met Phe	Ser Gly	Leu Ile	Phe Ser	Val Glu	Val Pro	Phe									
4415			4420			4425										
Ser Lys	Phe Ala	Asn Asn	Thr Glu	Gly Gln	Cys Gly	Thr Cys	Thr									
4430			4435			4440										
Asn Asp	Arg Lys	Asp Glu	Cys Arg	Thr Pro	Arg Gly	Thr Val	Val									
4445			4450			4455										
Ala Ser	Cys Ser	Glu Met	Ser Gly	Leu Trp	Asn Val	Ser Ile	Pro									
4460			4465			4470										
Asp Gln	Pro Ala	Cys His	Arg Pro	His Pro	Thr Pro	Thr Thr	Val									
4475			4480			4485										
Gly Pro	Thr Thr	Val Gly	Ser Thr	Thr Val	Gly Pro	Thr Thr	Val									
4490			4495			4500										

ES 2 719 624 T3

Gly Ser Thr Thr Val Gly Pro Thr Thr Pro Pro Ala Pro Cys Leu
4505 4510 4515

Pro Ser Pro Ile Cys His Leu Ile Leu Ser Lys Val Phe Glu Pro
4520 4525 4530

Cys His Thr Val Ile Pro Pro Leu Leu Phe Tyr Glu Gly Cys Val
4535 4540 4545

Phe Asp Arg Cys His Met Thr Asp Leu Asp Val Val Cys Ser Ser
4550 4555 4560

Leu Glu Leu Tyr Ala Ala Leu Cys Ala Ser His Asp Ile Cys Ile
4565 4570 4575

Asp Trp Arg Gly Arg Thr Gly His Met Cys Pro Phe Thr Cys Pro
4580 4585 4590

Ala Asp Lys Val Tyr Gln Pro Cys Gly Pro Ser Asn Pro Ser Tyr
4595 4600 4605

Cys Tyr Gly Asn Asp Ser Ala Ser Leu Gly Ala Leu Arg Glu Ala
4610 4615 4620

Gly Pro Ile Thr Glu Gly Cys Phe Cys Pro Glu Gly Met Thr Leu
4625 4630 4635

Phe Ser Thr Ser Ala Gln Val Cys Val Pro Thr Gly Cys Pro Arg
4640 4645 4650

Cys Leu Gly Pro His Gly Glu Pro Val Lys Val Gly His Thr Val
4655 4660 4665

Gly Met Asp Cys Gln Glu Cys Thr Cys Glu Ala Ala Thr Trp Thr
4670 4675 4680

Leu Thr Cys Arg Pro Lys Leu Cys Pro Leu Pro Pro Ala Cys Pro
4685 4690 4695

Leu Pro Gly Phe Val Pro Val Pro Ala Ala Pro Gln Ala Gly Gln
4700 4705 4710

Cys Cys Pro Gln Tyr Ser Cys Ala Cys Asn Thr Ser Arg Cys Pro
4715 4720 4725

Ala Pro Val Gly Cys Pro Glu Gly Ala Arg Ala Ile Pro Thr Tyr
4730 4735 4740

ES 2 719 624 T3

Gln Glu Gly Ala Cys Cys Pro Val Gln Asn Cys Ser Trp Thr Val
4745 4750 4755

Cys Ser Ile Asn Gly Thr Leu Tyr Gln Pro Gly Ala Val Val Ser
4760 4765 4770

Ser Ser Leu Cys Glu Thr Cys Arg Cys Glu Leu Pro Gly Gly Pro
4775 4780 4785

Pro Ser Asp Ala Phe Val Val Ser Cys Glu Thr Gln Ile Cys Asn
4790 4795 4800

Thr His Cys Pro Val Gly Phe Glu Tyr Gln Glu Gln Ser Gly Gln
4805 4810 4815

Cys Cys Gly Thr Cys Val Gln Val Ala Cys Val Thr Asn Thr Ser
4820 4825 4830

Lys Ser Pro Ala His Leu Phe Tyr Pro Gly Glu Thr Trp Ser Asp
4835 4840 4845

Ala Gly Asn His Cys Val Thr His Gln Cys Glu Lys His Gln Asp
4850 4855 4860

Gly Leu Val Val Val Thr Thr Lys Lys Ala Cys Pro Pro Leu Ser
4865 4870 4875

Cys Ser Leu Asp Glu Ala Arg Met Ser Lys Asp Gly Cys Cys Arg
4880 4885 4890

Phe Cys Pro Leu Pro Pro Pro Pro Tyr Gln Asn Gln Ser Thr Cys
4895 4900 4905

Ala Val Tyr His Arg Ser Leu Ile Ile Gln Gln Gln Gly Cys Ser
4910 4915 4920

Ser Ser Glu Pro Val Arg Leu Ala Tyr Cys Arg Gly Asn Cys Gly
4925 4930 4935

Asp Ser Ser Ser Met Tyr Ser Leu Glu Gly Asn Thr Val Glu His
4940 4945 4950

Arg Cys Gln Cys Cys Gln Glu Leu Arg Thr Ser Leu Arg Asn Val
4955 4960 4965

Thr Leu His Cys Thr Asp Gly Ser Ser Arg Ala Phe Ser Tyr Thr
4970 4975 4980

ES 2 719 624 T3

Glu Val Glu Glu Cys Gly Cys Met Gly Arg Arg Cys Pro Ala Pro
 4985 4990 4995

Gly Asp Thr Gln His Ser Glu Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ser Gln
 5000 5005 5010

Glu Ala Glu Ser Gly Ser Trp Glu Arg Gly Val Pro Val Ser Pro
 5015 5020 5025

Met His
 5030

<210> 37

<211> 921

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 37

Ala Cys Cys Ala Cys Cys Cys Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Cys
 1 5 10 15

Cys Thr Gly Thr Thr Ala Cys Thr Cys Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly
 20 25 30

Thr Cys Ala Thr Cys Thr Gly Cys Gly Thr Thr Gly Cys Ala Cys Cys
 35 40 45

Thr Gly Gly Ala Cys Thr Ala Ala Ala Thr Gly Gly Thr Thr Cys Gly
 50 55 60

Ala Cys Gly Thr Thr Gly Ala Cys Thr Thr Cys Cys Cys Gly Thr Cys
 65 70 75 80

Cys Cys Cys Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Cys Ala Cys Gly Gly Thr
 85 90 95

Gly Gly Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Gly Ala Ala Ala Cys Cys Thr
 100 105 110

Ala Thr Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Thr Cys Ala Thr Thr Cys Gly
 115 120 125

Thr Thr Cys Cys Gly Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Ala Thr Cys
 130 135 140

Thr Gly Cys Cys Gly Thr Cys Gly Thr Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly
 145 150 155 160

ES 2 719 624 T3

Ala Ala Ala Thr Cys Ala Cys Cys Cys Gly Thr Cys Thr Gly Cys Ala
 165 170 175

Gly Thr Gly Cys Cys Gly Thr Gly Cys Ala Gly Ala Gly Thr Cys Cys
 180 185 190

Cys Ala Cys Cys Cys Gly Gly Ala Gly Gly Thr Ala Thr Cys Thr Ala
 195 200 205

Thr Cys Gly Ala Ala Cys Ala Thr Cys Thr Gly Gly Gly Cys Cys Ala
 210 215 220

Gly Gly Thr Thr Gly Thr Gly Cys Ala Gly Thr Gly Cys Ala Gly Cys
 225 230 235 240

Cys Gly Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Gly Thr Cys Thr Gly Gly
 245 250 255

Thr Thr Thr Gly Cys Cys Gly Thr Ala Ala Cys Cys Ala Ala Gly Ala
 260 265 270

Thr Cys Ala Gly Cys Ala Gly Gly Gly Cys Cys Cys Gly Thr Thr Cys
 275 280 285

Ala Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Ala Ala Cys Thr
 290 295 300

Ala Thr Gly Ala Ala Gly Thr Cys Cys Gly Thr Gly Thr Cys Cys Thr
 305 310 315 320

Gly Thr Gly Cys Thr Gly Cys Gly Ala Ala Ala Cys Cys Cys Cys Ala
 325 330 335

Ala Ala Ala Gly Gly Cys Thr Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Ala
 340 345 350

Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys Cys Cys Cys Gly Gly Thr Thr Ala Cys
 355 360 365

Cys Gly Cys Gly Cys Cys Gly Thr Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Ala
 370 375 380

Ala Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys Gly Cys Gly Ala Cys Cys Ala
 385 390 395 400

Gly Cys Cys Cys Gly Ala Cys Cys Cys Ala Gly Ala Gly Cys Ala Cys

ES 2 719 624 T3

				405						410						415
Cys	Thr	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Gly	Gly	Cys	Ala	Gly	Ala	Ala	Ala	
			420					425					430			
Thr	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Cys	
		435					440					445				
Thr	Gly	Gly	Thr	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	
	450					455					460					
Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly	
465					470					475					480	
Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	
				485					490						495	
Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	
			500					505					510			
Thr	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys	Cys	
		515					520					525				
Ala	Cys	Thr	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	
	530					535						540				
Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	
545					550					555					560	
Cys	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Cys	Cys	Gly	Cys	Ala	Gly	
				565					570					575		
Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	
			580					585						590		
Cys	Gly	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Thr	Cys	Thr	Ala	Cys	
		595					600					605				
Cys	Ala	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Gly	Ala	Cys	Thr	
	610					615						620				
Ala	Gly	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Cys	Gly	Ala	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	
625					630					635					640	
Cys	Thr	Cys	Gly	Thr	Ala	Cys	Thr	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Ala	Thr	
				645					650					655		

ES 2 719 624 T3

Cys Ala Thr Thr Thr Cys Cys Gly Cys Cys Cys Cys Thr Ala Cys Gly
660 665 670

Ala Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys Cys Ala Cys Thr Thr Cys Thr Ala
675 680 685

Gly Cys Cys Cys Thr Ala Cys Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys
690 695 700

Cys Ala Cys Gly Thr Cys Cys Gly Cys Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys
705 710 715 720

Ala Cys Cys Thr Cys Cys Ala Cys Thr Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly
725 730 735

Cys Ala Cys Cys Ala Ala Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Ala Cys
740 745 750

Thr Ala Cys Gly Ala Gly Cys Ala Cys Gly Cys Cys Gly Cys Ala Gly
755 760 765

Ala Cys Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Ala Cys Cys Thr Cys Thr Gly
770 775 780

Cys Gly Gly Cys Ala Ala Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Thr Ala Cys
785 790 795 800

Cys Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Gly Cys Thr Cys Thr Gly Gly Cys
805 810 815

Ala Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Gly Ala Gly Cys Cys Cys Gly Gly
820 825 830

Thr Gly Ala Cys Cys Ala Cys Cys Ala Cys Thr Ala Gly Cys Ala Cys
835 840 845

Cys Gly Cys Thr Thr Cys Thr Gly Thr Gly Thr Cys Cys Ala Ala Gly
850 855 860

Ala Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys Thr Cys Ala Cys Gly
865 870 875 880

Thr Gly Thr Cys Thr Gly Thr Thr Thr Cys Thr Ala Ala Ala Ala Cys
885 890 895

Gly Ala Cys Cys Cys Ala Cys Thr Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Gly
900 905 910

ES 2 719 624 T3

Gly Thr Thr Ala Cys Cys Cys Gly Cys
 915 920

<210> 38

<211> 306

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento del extremo terminal N de MUC5AC (largo)

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Arg
 305

<210> 39

<211> 384

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento del extremo terminal N de MUC5AC (largo)

<400> 39

```
actactcatt ctcaacctgt aactcgtgat tgtcatctgc gctgtacttg gactaaatgg      60
tttgacgtgg acttcccgtc ccctggcccg cacggtggtg ataaagaaac ctacaataac      120
atcattcgct ctggtgagaa aatctgccgt cgtccggaag aatcactcg tctgcaatgt      180
cgtgccgaat cccaccgga ggtgagcatc gaacacctgg gtcaggttgt tcagtgttct      240
cgtgaggaag gtctggtatg ccgtaaccaa gatcagcaag gccattcaa aatgtgcctg      300
aactacgaag ttcgtgttct gtggtgcgag actccgaaag gttgcccggt tacgagcacg      360
cctgtcaccg caccgagcac gccg                                             384
```

10 <210> 40

<211> 128

<212> PRT

ES 2 719 624 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Fragmento del extremo terminal N de MUC5AC (corto)

<400> 40

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<210> 41

<211> 384

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Fragmento del extremo terminal N de MUC5AC (corto)

<400> 41

actactcatt ctcaacctgt aactcgtgat tgtcatctgc gctgtacttg gactaaatgg 60
tttgacgtgg acttcccgtc ccctggcccc cacggtggtg ataaagaaac ctacaataac 120
atcattcgct ctggtgagaa aatctgccgt cgtccggaag aatcactcg tctgcaatgt 180
cgtgccgaat cccacccgga ggtgagcatc gaacacctgg gtcaggttgt tcagtgttct 240
cgtgaggaag gtctggtatg ccgtaaccaa gatcagcaag gccattcaa aatgtgcctg 300
aactacgaag ttctgttct gtgttgcgag actccgaaag gttgcccggt tacgagcacg 360
cctgtcaccg caccgagcac gccg 384

<210> 42

<211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 5 <223> Repetición en tándem de MUC5AC
 <400> 42

Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ala Pro
1 5

<210> 43
 <211> 8
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Repetición en tándem de MUC5AC
 <400> 43

Gly Ser Thr Pro Ser Pro Val Pro
1 5

15 <210> 44
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 20 <220>
 <223> Repetición en tándem de MUC5AC
 <400> 44

Thr Ala Ser Thr Thr Ser Gly Pro
1 5

<210> 45
 25 <211> 85
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (85)
 30 <400> 45

ES 2 719 624 T3

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
35 40 45

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
50 55 60

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala
85

<210> 46

<211> 136

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (136)

<400> 46

ES 2 719 624 T3

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
 20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
 35 40 45

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
 50 55 60

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
 65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
 85 90 95

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn
 100 105 110

Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg
 115 120 125

Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys
 130 135

<210> 47

<211> 151

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (151)

<400> 47

ES 2 719 624 T3

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
35 40 45

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
50 55 60

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
85 90 95

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn
100 105 110

Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg
115 120 125

Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro
130 135 140

Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro
145 150

<210> 48

<211> 187

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (187)

<400> 48

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
35 40 45

ES 2 719 624 T3

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
50 55 60

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
85 90 95

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn
100 105 110

Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg
115 120 125

Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro
130 135 140

Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro Ser Gly Arg Ala Thr Ser Pro Thr Gln
145 150 155 160

Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr
165 170 175

Ser Thr Thr Ser Thr Pro Gln Thr Ser Thr Thr
180 185

<210> 49

<211> 289

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (289)

<400> 49

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
35 40 45

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
50 55 60

ES 2 719 624 T3

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
85 90 95

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn
100 105 110

Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg
115 120 125

Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro
130 135 140

Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro Ser Gly Arg Ala Thr Ser Pro Thr Gln
145 150 155 160

Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr
165 170 175

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

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

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

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

Ser Ile Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Thr Thr
245 250 255

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

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

Ser

<210> 50

<211> 338

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Constructo de truncamiento de MUC5AC (338)

5 <400> 50

ES 2 719 624 T3

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

Ala Leu Ala Leu Ala Cys Thr Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg
 20 25 30

Asp Cys His Leu Arg Cys Thr Trp Thr Lys Trp Phe Asp Val Asp Phe
 35 40 45

Pro Ser Pro Gly Pro His Gly Gly Asp Lys Glu Thr Tyr Asn Asn Ile
 50 55 60

Ile Arg Ser Gly Glu Lys Ile Cys Arg Arg Pro Glu Glu Ile Thr Arg
 65 70 75 80

Leu Gln Cys Arg Ala Glu Ser His Pro Glu Val Ser Ile Glu His Leu
 85 90 95

Gly Gln Val Val Gln Cys Ser Arg Glu Glu Gly Leu Val Cys Arg Asn
 100 105 110

Gln Asp Gln Gln Gly Pro Phe Lys Met Cys Leu Asn Tyr Glu Val Arg
 115 120 125

Val Leu Cys Cys Glu Thr Pro Lys Gly Cys Pro Val Thr Ser Thr Pro
 130 135 140

Val Thr Ala Pro Ser Thr Pro Ser Gly Arg Ala Thr Ser Pro Thr Gln
 145 150 155 160

Ser Thr Ser Ser Trp Gln Lys Ser Arg Thr Thr Thr Leu Val Thr Thr
 165 170 175

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

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

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

ES 2 719 624 T3

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

Ser Ile Ile Ser Ala Pro Thr Thr Ser Thr Thr Ser Ser Pro Thr Thr
245 250 255

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

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

Ser Thr Thr Ser Ser Ser Gly Thr Thr Pro Ser Pro Val Thr Thr Thr
290 295 300

Ser Thr Ala Ser Val Ser Lys Thr Ser Thr Ser His Val Ser Val Ser
305 310 315 320

Lys Thr Thr His Ser Gln Pro Val Thr Arg Cys Thr His His His His
325 330 335

His His

<210> 51

<211> 21

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> ARNpi ID# s9074 (sentido)

<400> 51

agaugugccu caacuacgat t 21

10 <210> 52

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> ARNpi ID# s9074 (antisentido)

<400> 52

ucguaguuga ggcacaut g 21

<210> 53

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNpi ID# s9075 (sentido)
 <400> 53
 5 gcucuggaac gugagcauat t 21
 <210> 54
 <211> 21
 <212> ARN
 <213> Secuencia Artificial
 10 <220>
 <223> ARNpi ID# s9075 (antisentido)
 <400> 54
 uaugcucacg uuccagagcc g 21
 <210> 55
 15 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNpi ID# s9076
 20 <400> 55
 gcgugcucgu cgacaacuat t 21
 <210> 56
 <211> 21
 <212> ARN
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> ARNpi ID# s9076 (antisentido)
 <400> 56
 uaguugucga cgagcacgcg g 21
 30 <210> 57
 <211> 965
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 35 <223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1
 <400> 57

ES 2 719 624 T3

atgagaatac cattaattag ctagggacca aaattcaaag acaaaatgga ttttcaggtg 60
cagatthttca gcttctctgct aatcagtgcc tcagtcatac tgtccagagg acaagttggt 120
ctcaccagct ctccagtaat catgtctgca tctccagggg agaaggcac catgacctgc 180
agtgccagct caagtataag ttacatgtac tgggtaccagc agaagccagg cacctcccc 240
aaaagatgga tttatgacac atccaaactg gcttctggag tccctgctcg cttcagtggc 300
agtgggtctg ggacctotta ttctctcaca atcagcaaca tggaggctgg agatgctgcc 360
acttattact gccatcagcg ggattcttac ccatggacgt tccgtggagg caccaacctg 420
gaaatcaaac gggctgatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag 480
ttaacatctg gaggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctacct caaagacatc 540
aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact 600
gatcaggaca gcaaagacag cacctacagc atgagcagca ccctcacgtt gaccaaggac 660
gagtatgaac gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc 720
attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtgt tagagacaaa ggtcctgaga cgccaccacc 780
agctccccag ctccatccta tcttcccttc taaggctctg gaggcttccc cacaagcgac 840
ctaccactgt tgcgggtgctc caaacctcct ccccacctcc ttctcctcct cctccctttc 900
cttggtcttt atcatgctaa tatttgaga aaatattcaa taaagtgagt ctttgcactt 960
gaaaa 965

<210> 58

<211> 235

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo NPC-1

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (46)..(55)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

15 <222> (71)..(77)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (110)..(118)

20 <223> CDR3

ES 2 719 624 T3

<400> 58

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 59

5 <211> 10

ES 2 719 624 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera de NPC-1

5 <400> 59

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

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena ligera de NPC-1

<400> 60

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

15 <210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> CDR3 de cadena ligera del anticuerpo NPC-1

<400> 61

His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 62

<211> 1520

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1

<400> 62

ES 2 719 624 T3

```

ttttccatcc tcttctcata gagcctccat cagacatgg ctgtcctggc actgctcctc      60
tgcctgggtga cattccaag ctgtgtcctg tcccagggtgc agctgaagga gtcaggacct      120
gacctgggtgg cgccctcaca gagcctgtcc atcacatgca ctgtctcagg attctcatta      180
agcaaatttg gtgtaaactg ggttcgccag cctccaggaa agggctctgga gtggctggga      240
gtaatatggg gtgacgggag cacaagttat aattcaggtc tcatatcaag actgagcatc      300
agcaaggaga actccaagag ccaggttttc ttaaaactga acagtctgca agctgatgac      360
acagccacat actactgtgt caaacggggg ggtgactact ggggtcacgg aacctcagtc      420
accgtctcct cagcaaaaac gacaccccca tctgtctatc cactggcccc tggatctgct      480
gccccaaacta actccatggg gaccctggga tgcctgggtca agggctatth ccctgagcca      540
gtgacagtga cctggaactc tggatccctg tccagcgggtg tgcacacctt cccagctgtc      600
ctgcagtctg acctctacac tctgagcagc tcagtgactg tcccctccag cacctggccc      660
agcgagaccg tcacctgcaa cgttgcccac ccggccagca gcaccaaggt ggacaagaaa      720
attgtgccca gggattgtgg ttgtaagcct tgcatatgta cagtcccaga agtatcatct      780
gtcttcatct tcccccaaa gcccaaggat gtgctcacca ttactctgac tccaaaggtc      840
acgtgtggtg tggtagacat cagcaaggat gatcccgagg tccagttcag ctggtttgta      900
gatgtggagg tgcacacagc tcagacgcaa ccccgaggagg agcagttcaa cagcactttc      960
cgctcagtca gtgaacttcc catcatgcac caggactggc tcaatggcaa ggagttcaaa     1020
tgcaggggtca acagtgcagc tttccctgcc cccatcgaga aaaccatctc caaaaacaaa     1080
ggcagaccga aggtccaca ggtgtacacc attccacctc ccaaggagca gatggccaag     1140
gataaagtca gtctgacctg catgataaca gacttcttcc ctgaagacat tactgtggag     1200
tggcagtgga atgggcagcc agcggagaac tacaagaaca ctcagcccat catggacaca     1260
gatggctctt acttcgtcta cagcaagctc aatgtgcaga agagcaactg ggagggcagga     1320
aatactttca cctgctctgt gttacatgag ggcctgcaca accaccatac tgagaagagc     1380
ctctcccact ctccctggtaa atgatcccag tgtccttgga gccctctggt cctacaggac     1440
tctgacacct acctccacct ctccctgtat aaataaagca cccagcactg ccttgggacc     1500
ctgcaaaaaa aaaaaaaaaa                                         1520

```

<210> 63

<211> 456

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo NPC-1

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

ES 2 719 624 T3

<222> (49)..(54)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

5 <222> (69)..(84)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (114)..(121)

10 <223> CDR3

<400> 63

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

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

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

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

ES 2 719 624 T3

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

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

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

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

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

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

Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly
 165 170 175

Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp
 180 185 190

Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro
 195 200 205

Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys
 210 215 220

Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile
 225 230 235 240

Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro
 245 250 255

Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val
 260 265 270

Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val
 275 280 285

Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln
 290 295 300

Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln
 305 310 315 320

ES 2 719 624 T3

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala
 325 330 335
 Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro
 340 345 350
 Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala
 355 360 365
 Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu
 370 375 380
 Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr
 385 390 395 400
 Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr
 405 410 415
 Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe
 420 425 430
 Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys
 435 440 445
 Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys
 450 455

<210> 64

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada del anticuerpo NPC-1

<400> 64

Ser Lys Phe Gly Val Asn
 1 5

10 <210> 65

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> CDR2 de cadena pesada de NPC-1

<400> 65

ES 2 719 624 T3

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

<210> 66

<211> 8

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 66

Cys Val Lys Pro Gly Gly Asp Tyr
 1 5

10

<210> 67

<211> 737

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo quimérico NPC-1

<400> 67

```

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

<210> 68

20 <211> 235

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera del anticuerpo quimérico NPC-1 con péptido señal

<220>

<221> SEÑAL

<222> (1)..(22)

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (46)..(55)

<223> CDR1

<220>

10 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (71)..(77)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

15 <222> (110)..(118)

<223> CDR3

<400> 68

ES 2 719 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 69

<211> 10

5 <212> PRT

ES 2 719 624 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

<400> 69

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

<210> 70

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

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

<400> 70

 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
 1 5

<210> 71

15 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

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

20 <400> 71

 His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 72

<211> 1418

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo quimérico NPC-1

<400> 72

ES 2 719 624 T3

gagcgggtacc gccaccatgg cagtgctggc ccttcttcta tgtctggtga ccttcccatc 60
ctgcgtcctg agccaggtac aactgaagga gtcgggccca gacctagtgg ctccgtcaca 120
atcactctcc attacgtgca ctgtctccgg cttctctttg tctaaattcg gcgtgaattg 180
ggtgcgacag cccccggga aggggcttga gtggttagga gttatctggg gtgacggctc 240
aaccagctac aactcaggac taatctcagc cttgtcaatt tcaaaggaga attcaaagtc 300
tcaggtgttc cttaaactca actcgctgca agccgacgat accgcaacct attactgctg 360
caaacctggc ggggactact ggggccatgg cacctccgtc acagtgagtt ccgcatccac 420
aaaggtgcc agtggttttc ctttggcgcc ctctagcaaa tcgacatctg gcggcacagc 480
cgcacttggg tgcttggtta aagactactt ccccgaaaccg gtgacagtat cttggaactc 540
tggcgctctt accagcggag ttcatacctt ccctgccgta ttacagtcta gcgggcccta 600
ctccctctcc tctgtcgtga cagtcccaag ctcttctctg ggaactcaaa cctacatctg 660
caatgtgaac cataaaccta gcaacacgaa agtggacaaa aaggtcgaac ccaagagttg 720
cgacaagaca cacacctgcc ctcttctgctc tgctccagag ctctctggcg gacctagcgt 780
tttcttggtc cctccgaaac caaaggacac cttgatgatt tctcggacc ccgaggtgac 840
atgtgtagta gttgatgtct cccacgagga ccctgaggtc aagttaatt ggtatgtgga 900
cgggtgtggag gtccacaacg ccaaaaacaaa accacgggag gaacagtaca attccacata 960
tagggtggtg agcgtcctta ccgtcctgca tcaggattgg ttaaattgta aggagtataa 1020
gtgtaagggtg tctaacaagg ctctgcctgc tcccatcgaa aaaactataa gtaaggccaa 1080
aggacagccc agggaacctc aggtgtatac tcttccaccc agtagagatg agctgactaa 1140
aaaccaggtg tccctgactt gtctggtgaa gggattttac ccatccgata tcgccgtgga 1200
atgggagtcc aacggacagc cagaaaacaa ttataaaact atgccaccag tgctggatag 1260
tgatggtagt tttttctgt acagtaagct gactgttgat aagagtagat ggcagcaggg 1320
taatgtttt agttgtagcg ttatgcacga agctctgcac aatcactata ctcagaagag 1380
cctgagcctg agccccgta agtgatgagg taccgagc 1418

<210> 73

<211> 462

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada del anticuerpo quimérico NPC-1

<220>

<221> SEÑAL

10 <222> (1)..(19)

<400> 73

ES 2 719 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
130 135 140

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
145 150 155 160

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
165 170 175

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
180 185 190

Gly Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
195 200 205

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
210 215 220

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

ES 2 719 624 T3

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena del anticuerpo quimérico NPC-1

5 <400> 74

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

<210> 75

<211> 16

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR2 de cadena pesada del anticuerpo quimérico NPC-1

<400> 75

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

15 <210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> CDR3 de cadena pesada del anticuerpo quimérico NPC-1

<400> 76

Pro	Gly	Gly	Asp	Tyr
1				5

<210> 77

<211> 735

25 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de NEO 103 humanizado

<400> 77

ES 2 719 624 T3

aagcttgcca ccatgaagta cctgctgccc accgctgctg ctggcttgct gctgctggca	60
gctcagcctg ccatggccga gatcgtgctg acccagtctc ctggcaccct gtctctgagc	120
cctggcgaga gagctaccct gtcctgctcc gcctcctcca gcatctccta catgtactgg	180
tatcagcaga agccccggcca ggccccctcgg ctgctgatct acgatacctc caagctggcc	240
tccggcatcc ccgacagatt ctccggctct ggctctggca ccgacttcac cctgaccatc	300
tccccgctgg aaccogagga cttcgccctg tactactgcc accagcggga ctctacccc	360
tggacctttg gccagggcac caagctggaa atcaagcgga ccgtggccgc tccctccgtg	420
ttcatcttcc caccttccga cgagcagctg aagtccggca ccgcttctgt cgtgtgcctg	480
ctgaacaact tctacccccg cgaggccaag gtgcagtggga aggtggacaa cgccctgcag	540
tccggcaact cccaggaatc cgtgaccgag caggactcca aggacagcac ctactccctg	600
tcctctaccc tgaccctgtc caaggccgac tacgagaagc acaaggtgta cgctgcgaa	660
gtgaccacc aggccctgtc tagccccgtg accaagtctt tcaaccgggg cgagtgctga	720
tgaggatcct gatga	735

<210> 78

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena ligera de NEO 103 humanizado

<400> 78

ES 2 719 624 T3

Lys Leu Ala Thr Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala Glu Ile Val Leu Thr Gln
 20 25 30

Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser
 35 40 45

Cys Ser Ala Ser Ser Ser Ile Ser Tyr Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys
 50 55 60

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

Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85 90 95

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr
 100 105 110

Cys His Gln Arg Asp Ser Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 115 120 125

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

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
 145 150 155 160

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

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
 180 185 190

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

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
 210 215 220

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

<210> 79

<211> 1437

5 <212> ADN

ES 2 719 624 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de NEO 103 humanizado

<400> 79

aagcttgcca ccatggacct gctgtgcaag aacatgaagc acctgtgggt ctttctgctg	60
ctgggtggccg ctcccagatg ggtgctgtct caggtgcagc tggtggaatc tggccctggc	120
ctgggtgcagc cttccagatc cctgtctctg acctgctcct ccagcggctt cagcctgtcc	180
aagttcggcg tgaactgggt gcgacagcct cctggcaagg gcctggaatg ggtgggagtg	240
atctggggcg acggctccac ctccataaac tccggcctga tctccagagt gaccatctcc	300
cgggacacct ccaagaacca gctgttcctg aagatggact ccctgaccgc cgaggacacc	360
gccgtgtact actgtgctag acctggcggc gactactggg gccagggcac aacagtgacc	420
gtgtcctccg cttccaccaa gggcccctct gtgtttcctc tggccccctc cagcaagtcc	480
acctctggtg gaactgccgc tctgggctgc ctctgtgaagg actacttccc cgagcccgtg	540
acagtgtcct ggaactctgg cgctctgacc tccggcgtgc acacctttcc agctgtgctg	600
cagtccagcg gcctgtactc cctgtcctcc gtctgtaccg tgccttcag ctctctgggc	660
accagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagccctcca ataccaaggt ggacaagaag	720
gtggaaccga agtcctgcga caagaccac acctgtcccc ctgtcctgc ccctgaactg	780
ctgggcggac cttccgtgtt cctgttcccc ccaaagccca aggacacct gatgatctcc	840
cggacccccg aagtgacctg cgtgggtggtg gatgtgtccc acgaggacct tgaagtgaag	900
ttcaattggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgccca agaccaagcc tagagaggaa	960
cagtacaact ccacctaccg ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcatca ggactggctg	1020
5 aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggccc tgcctgcccc catcgaaaag	1080
accatcagca aggctaaggg ccagccccgc gagccccagg tgtacacact gcctccatcc	1140
cgggaagaga tgaccaagaa tcaggtgtcc ctgacctgtc tctgaaagg cttctacccc	1200
tccgatatcg ccgtggaatg ggagtccaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc	1260
ccccctgtgc tggactccga cggctcattc ttctgtaca gcaagctgac agtggacaag	1320
tcccgtggc agcagggcaa cgtgttctcc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcacaac	1380
cactacacct agaagtccct gtccctgagc cccggcaagt gatgatgagg atcctga	1437

<210> 80

<211> 473

<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cadena pesada de NEO 103 humanizado

<400> 80

ES 2 719 624 T3

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

ES 2 719 624 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 719 624 T3

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

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

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 81

<211> 554

<212> ADN

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena ligera del anticuerpo 4B6

<400> 81

```

aacctgtggg gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga      60
aaaggtcact ttgaactgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa      120
ctacttggtc tggtaccagc aaaaaccagg gcagtctcct aaattactga tctactgggc      180
atccactagg gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagatth      240
cactctcacc atcaacagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc      300
ttataatctc ttcacgttcg gctcggggac aaagtmgaag taaaacgggc tgatgctgca      360
ccaactgtat ccatcttccc accatccagt gagcagtaa catctggagg tgcctcagtc      420
gtgtgcttct tgaacaactt ctaccccaa gacaccaatg tcaagtggaa gattgatggc      480
agtgaacgac aaaatggcgt cctgaacagt tggactgatc aggacagcaa agacagcacc      540
tacagcatga gcag      554
    
```

10 <210> 82

<211> 184

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cadena ligera del anticuerpo 4B6

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (30)..(41)

<223> CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 4B6

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (59)..(61)

<223> CDR2 de cadena ligera del anticuerpo 4B6

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (98)..(105)

<223> CDR3 de cadena ligera del anticuerpo 4B6

<400> 82

ES 2 719 624 T3

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

Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Leu Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu
20 25 30

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

Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
50 55 60

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

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

Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu
100 105 110

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

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

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Thr Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
145 150 155 160

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

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser
180

<210> 83

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena ligera del anticuerpo 4B6

<400> 83

ES 2 719 624 T3

Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr
 1 5 10

<210> 84

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena ligera de 4B6

<400> 84

Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Phe Thr
 1 5

10 <210> 85

<211> 351

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> cadena pesada de 4B6

<400> 85

tgaggtgcag	ctggaggagt	ctggagctga	actggcgagg	cccggggcct	cagtgaagct	60
gtcttgtaag	gcttctggct	actccttcac	tgactattat	ataaattggg	tgaagcagag	120
gactggacag	ggccttgagt	ggattggaga	aatttatacct	ttaggtggta	ctagtttcta	180
caatgagagg	ttcaaggaca	aggccacact	gactgcagac	aaatcctcca	gcacagtcta	240
catggaactc	agcagcctga	catctgagga	ctcggcagtc	tatttctgtg	caagagggga	300
taattattac	gacgtctact	ttgactactg	gggccaaagg	accacggtca	c	351

<210> 86

<211> 111

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> cadena pesada del anticuerpo 4B6

<220>

25 <221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (26)..(33)

<223> CDR1

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

30 <222> (51)..(58)

<223> CDR2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA MISCELÁNEA

<222> (97)..(109)

5 <223> CDR3

<400> 86

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Asp Asn Tyr Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

<210> 87

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR1 de cadena pesada de 4B6

<400> 87

15 Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr Tyr
1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> CDR2 de cadena pesada de 4B6

ES 2 719 624 T3

<400> 88

Ile Tyr Pro Leu Gly Gly Thr Ser
1 5

<210> 89

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> CDR3 de cadena pesada de 4B6

<400> 89

10 Ala Arg Gly Asp Asn Tyr Tyr Asp Val Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

Reivindicaciones

1. Un polipéptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos SLPDDWFRYINY (SEQ ID NO: 5).
2. Una proteína de fusión que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, en la que dicha proteína de fusión comprende opcionalmente una etiqueta detectable unida a la misma directa o indirectamente en forma covalente o no covalente en la que la etiqueta detectable se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en la etiqueta poliHis, la etiqueta FLAG, MBP, proteína GST y GFP.
3. Un conjugado que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, directa o indirectamente conjugado con un agente citotóxico, un agente terapéutico, etiqueta, carbohidrato, vehículo, inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina, o un agente inmunomodulador en el que
 - (i) dicho carbohidrato es opcionalmente manosa, fucosa, glucosa, GlcNA o maltosa.
 - (ii) dicho vehículo es hemocianina de lapa californiana (KLH), toxoide de difteria, toxoide de cólera, ovoalbúmina, albúmina de suero bovino (BSA), exoproteína A de *Pseudomonas* o proteínas de membrana externa microbiana (OMPS),
 - (iii) dicha etiqueta opcionalmente es una etiqueta quimioluminiscente, etiqueta paramagnética, tal como aluminio, manganeso, platino, oxígeno, lantano, lutecio, escandio, itrio, o galio, agente de contraste de MRI, etiqueta fluorescente, etiqueta bioluminiscente o etiqueta radiactiva; o
 - (iv) el agente citotóxico es opcionalmente una fracción que inhibe la síntesis de ADN, ARN o proteínas, un radionúclido o una proteína de inhibición ribosomal, 212Bi, 131I, 188Re, 90Y, vindesina, metotrexato, adriamicina, cisplatino, proteína antiviral hierba carmesí, exotoxina A de *Pseudomonas*, ricina, toxina de difteria, cadena A de ricina o enzima fosfolipasa citotóxica.
4. Una composición que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, la proteína de fusión de la reivindicación 2, o el conjugado de la reivindicación 3, y opcionalmente que comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, un vehículo diagnósticamente aceptable, adyuvante o excipiente.
5. Un kit de diagnóstico que comprende el polipéptido de la reivindicación 1, la proteína de fusión de la reivindicación 2, o el conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido está opcionalmente directa o indirectamente unido a un soporte de fase sólida o membrana celular y en el que dicho soporte de fase sólida es opcionalmente una perla, placa, matriz, polímero, tubo de ensayo, lámina, placa de cultivo o tira de prueba o un arreglo.
6. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido de la reivindicación 1 o la proteína de fusión de la reivindicación 2 en el que dicho polinucleótido está opcionalmente contenido en un vector de expresión, una célula huésped aislada que comprende dicho vector de expresión, un animal transgénico no humano que comprende dicha célula huésped, o preferiblemente una composición que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
7. El polipéptido aislado de la reivindicación 1, la proteína de fusión de la reivindicación 2, o el conjugado de la reivindicación 3, para uso en un método para tratar cáncer, en el que dicho cáncer se selecciona opcionalmente del grupo que consiste en cáncer de pulmón, mama, ovario, estómago, páncreas, útero, esofágico, colorrectal y de hígado, en el que dicho método opcionalmente ralentiza el crecimiento del tumor, promueve la regresión del tumor, activa la inmunidad específica del tumor y/o inhibe la metástasis y en el que dicho polipéptido, proteína de fusión o conjugado es opcionalmente administrado en combinación con otro anticuerpo, una linfoquina o un factor de crecimiento hematopoyético.
8. Un método para producir anticuerpos que comprende:
 - (a) inmunizar un ratón con un polipéptido de la reivindicaciones 1, una proteína de fusión de la reivindicación 2, o un conjugado de la reivindicación 3
 - (b) remover dicho bazo de ratón y preparar una suspensión de células individuales,
 - (c) fusionar una célula de bazo con una célula de mieloma,
 - (d) cultivar células después de la fusión en medio de selección de hibridoma,
 - (e) cultivar los hibridomas resultantes,
 - (f) seleccionar la producción del anticuerpo específico, y
 - (g) seleccionar hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

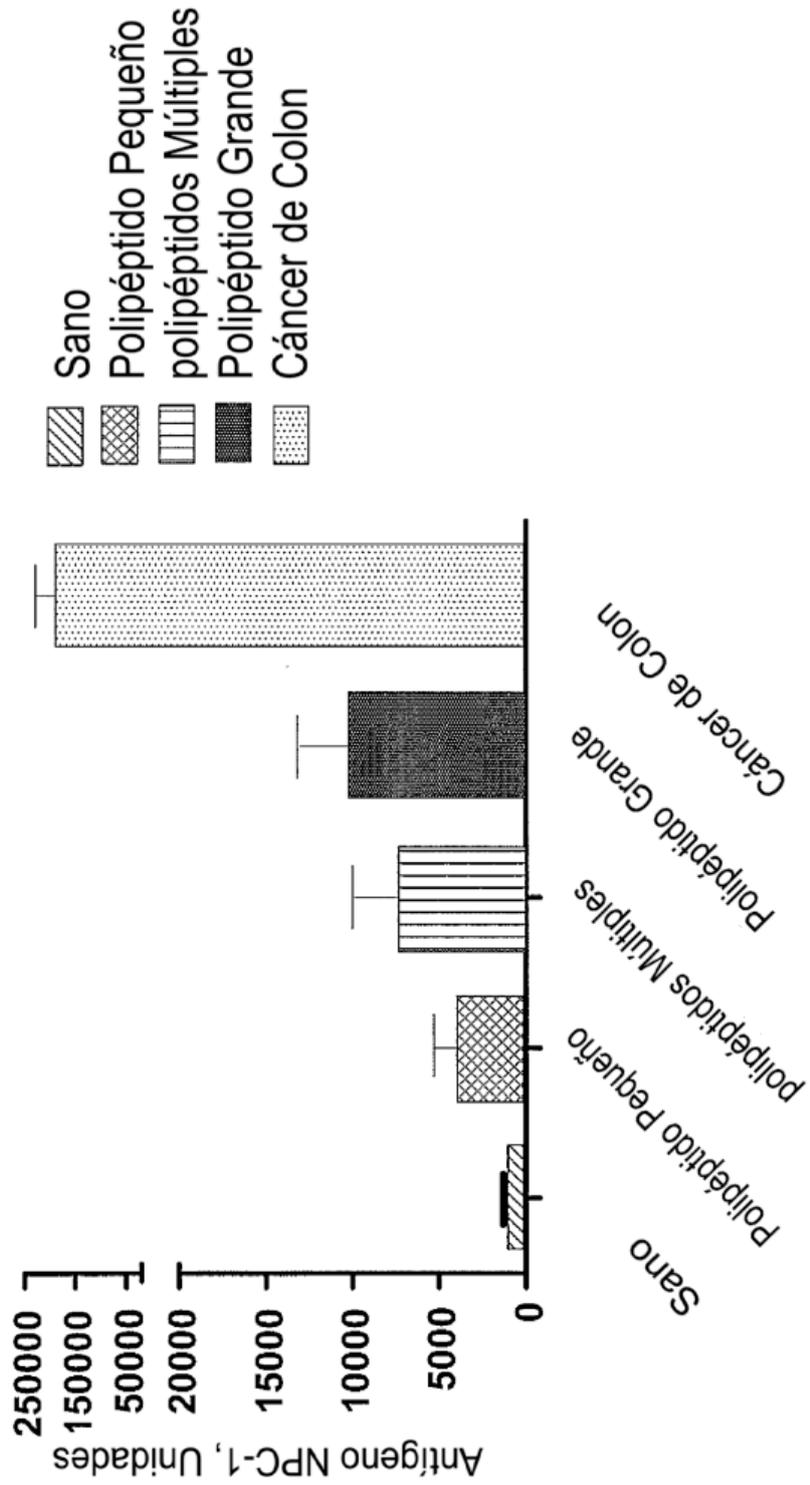
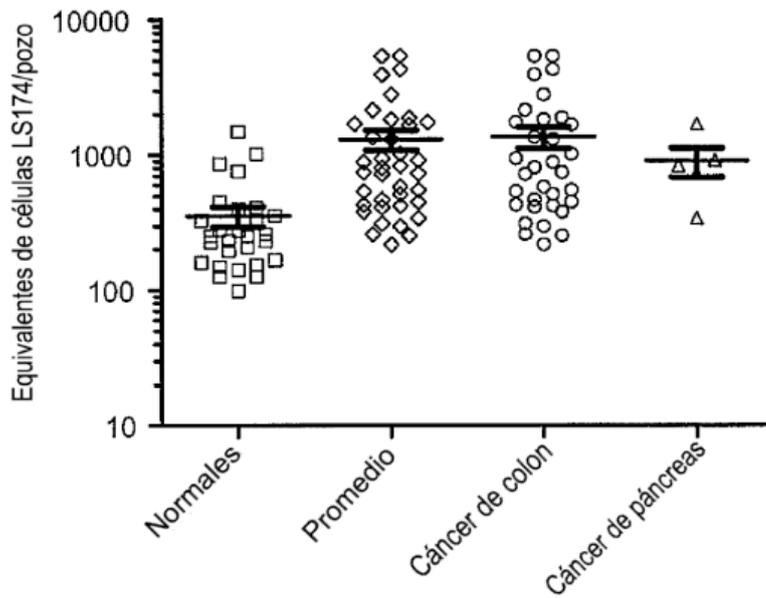
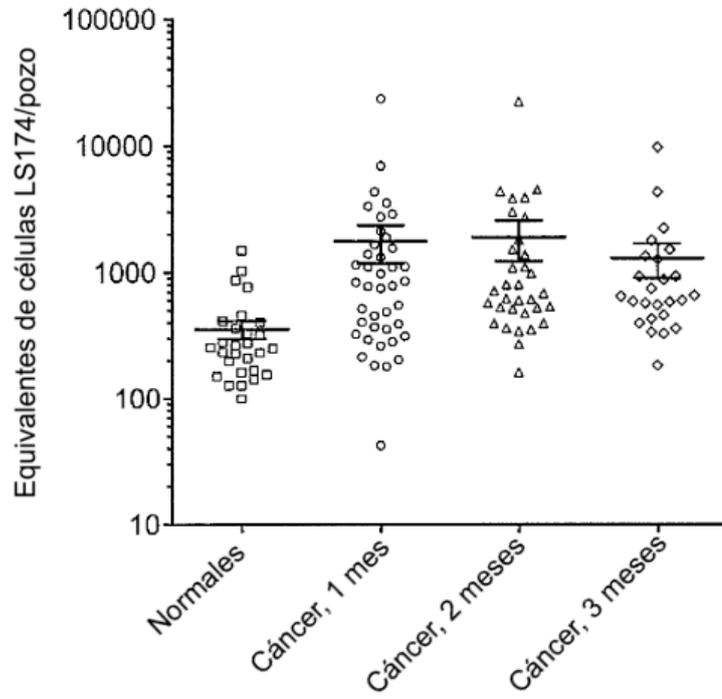
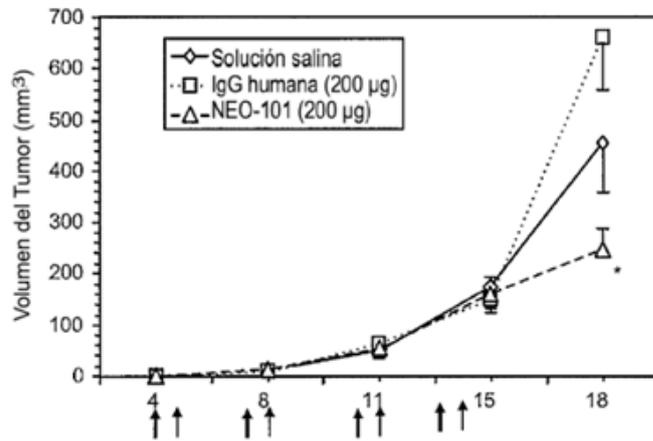
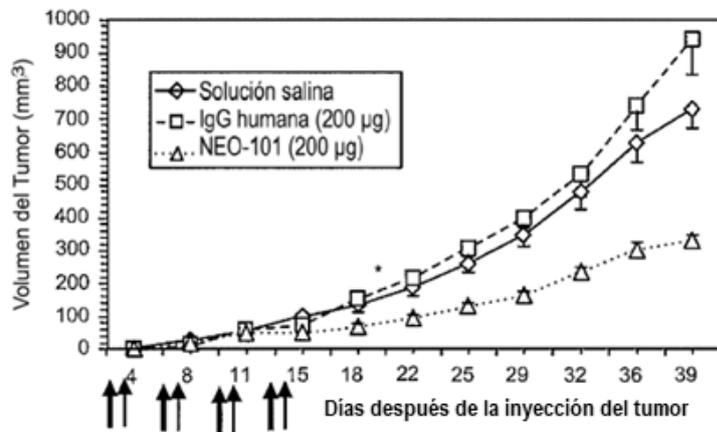
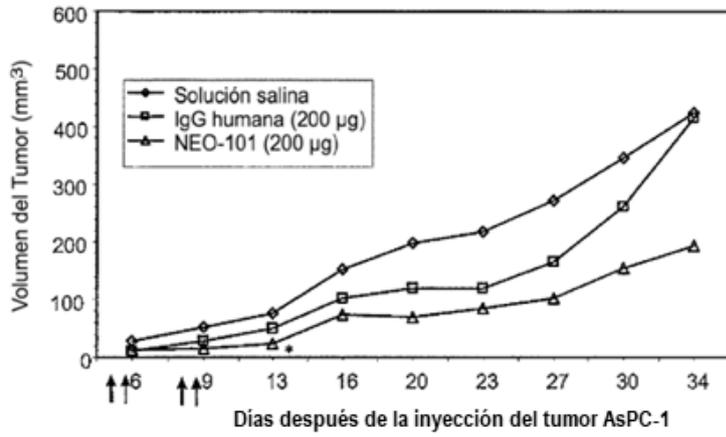


FIGURA 1





ES 2 719 624 T3

<u>4-1-4-C5</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-4-C9</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C10</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C9</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C7</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C3</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C2</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-3-C1</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-2-C6</u>	---FPEDYFRYTNQK-----	(SEQ ID NO: 4)
<u>4-1-4-C2</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C3</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C4</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C6</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C7</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C12</u>	--SLPDDWFRYINY-----	(SEQ ID NO: 5)
<u>4-1-4-C11</u>	--SFPVNCRCRYKK?-----	(SEQ ID NO: 6, 7)
<u>4-1-3-C12</u>	---FLEVYIRKVIIRVEVQRNFDRCLAESHTR	(SEQ ID NO: 8)
<u>4-1-2-C11</u>	AETVESCLAKSHTENSFTNV-----	(SEQ ID NO: 9)
<u>4-1-3-C4</u>	AETVESCLAKSHTENS-----	(SEQ ID NO: 10)
<u>4-1-2-C5</u>	WHTLP---EKSLDEN-----	(SEQ ID NO: 11)
<u>4-1-2-C8</u>	WHTLP---EKSLDEN-----	(SEQ ID NO: 11)
<u>4-1-2-C10</u>	WHTLP---EKSLDEN-----	(SEQ ID NO: 11)
<u>4-1-2-C7</u>	WHTLP---ESGEVTS-----	(SEQ ID NO: 12)
<u>4-1-2-C9</u>	WHTLP---ESGEVTS-----	(SEQ ID NO: 12)
<u>4-1-3-C5</u>	WHTLP---ESGEVTS-----	(SEQ ID NO: 12)
<u>4-1-3-C6</u>	WHTLP---ESGEVTS-----	(SEQ ID NO: 12)
<u>4-1-3-C8</u>	WHTLP---ESGEVTS-----	(SEQ ID NO: 12)
<u>4-1-2-C2</u>	----EYGLQQGTPNSK-----	(SEQ ID NO: 13)
<u>4-1-2-C4</u>	---FPAIMSRTPAAT-----	(SEQ ID NO: 14)
<u>4-1-3-C11</u>	---VHAIEDNWSPRG-----	(SEQ ID NO: 15)
<u>4-1-2-C1</u>	----EASKSSHTLWTD-----	(SEQ ID NO: 16)
<u>4-1-2-C12</u>	--SQKPTHIQKALS-----	(SEQ ID NO: 17)
<u>4-1-2-C3</u>	---FNDGGALSSLRR-----	(SEQ ID NO: 18)

FIGURA 6

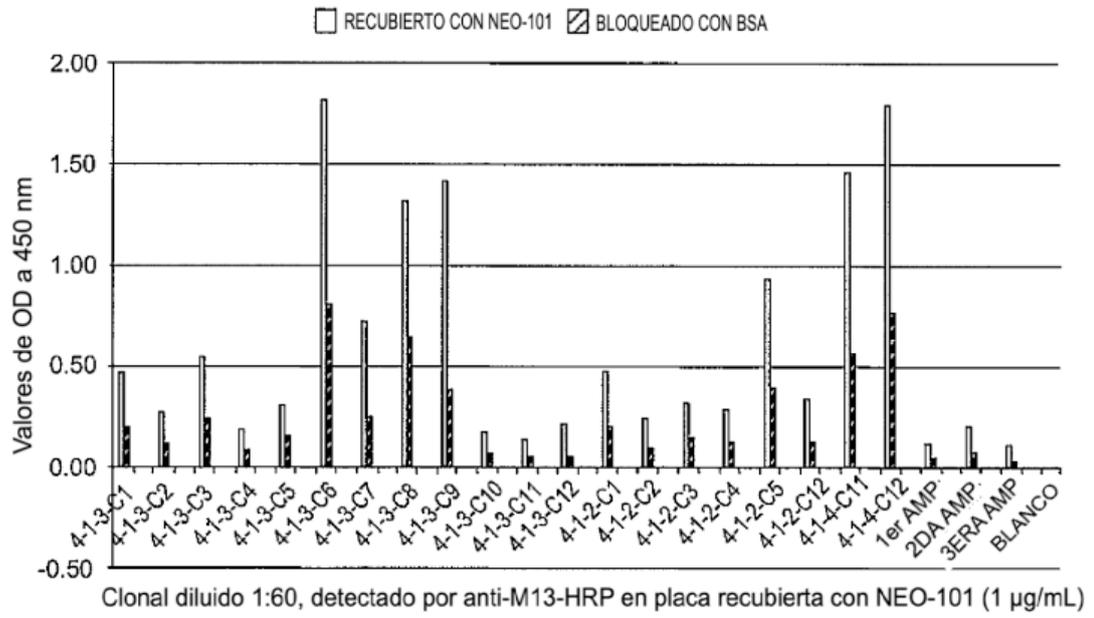


FIGURA 7

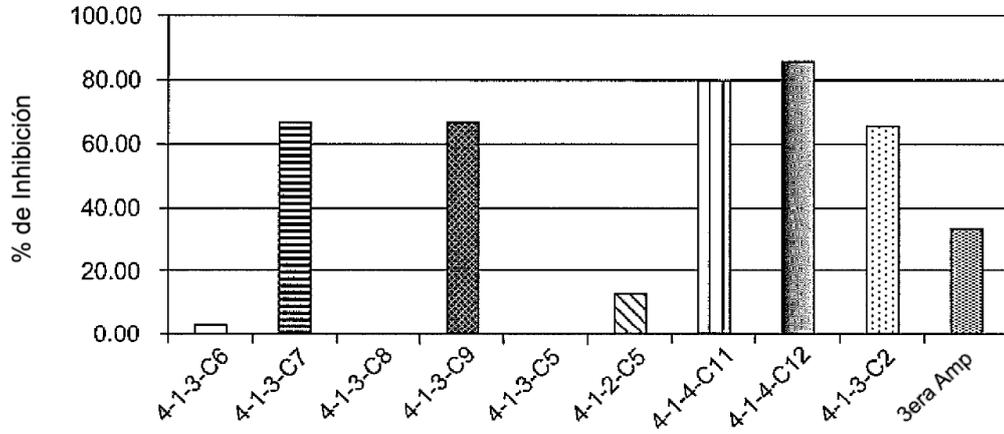


FIGURA 8A

- | | |
|--|--|
| □ 4-1-3-C6 + NEO-101-biotina (250ng/ml) | ▨ 4-1-3-C7 + NEO-101-biotina (250ng/ml) |
| ▩ 4-1-3-C8 + NEO-101-biotina (250ng/ml) | ▧ 4-1-3-C9 + NEO-101-biotina (250ng/ml) |
| ▪ 4-1-3-C5 + NEO-101-biotina (250ng/ml) | ▦ 4-1-2-C5 + NEO-101-biotina (250ng/ml) |
| ▬ 4-1-4-C11 + NEO-101-biotina (250ng/ml) | ▤ 4-1-4-C12 + NEO-101-biotina (250ng/ml) |
| ▮ 4-1-3-C2 + NEO-101-biotina (250ng/ml) | ▭ 3era Amp + NEO-101-biotina (250ng/ml) |

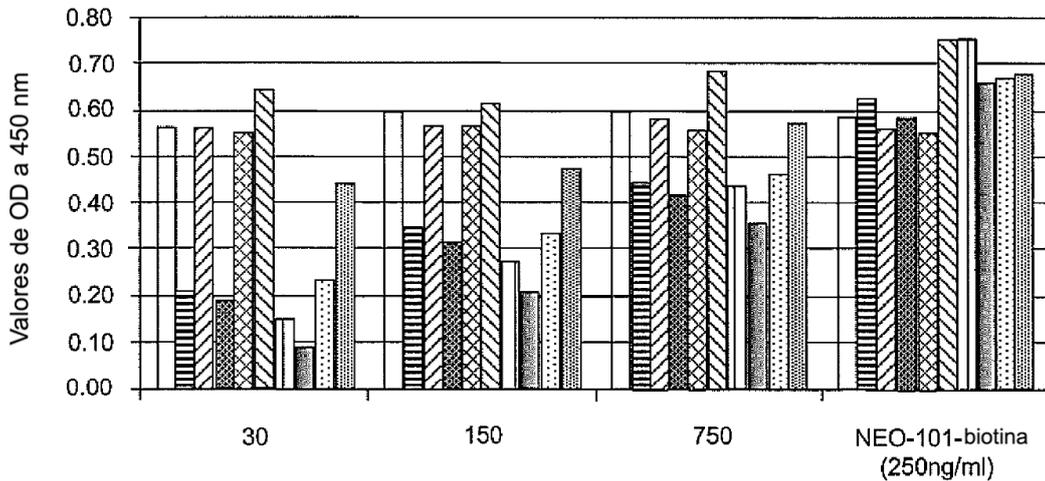


FIGURA 8B

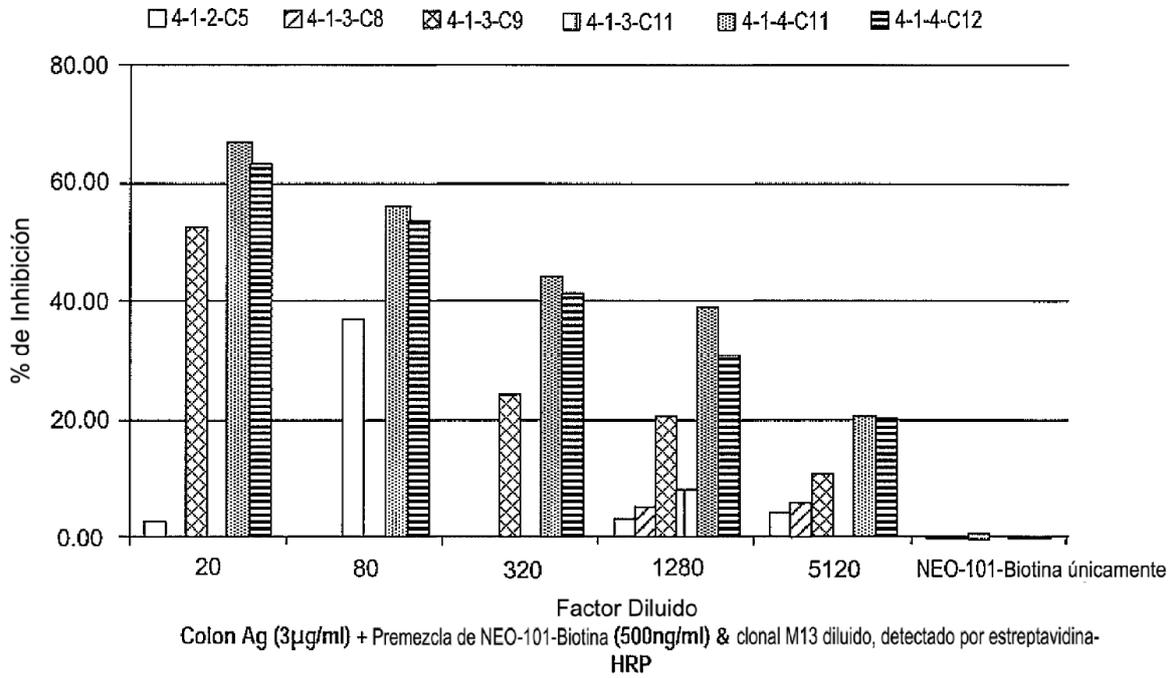


FIGURA 9A

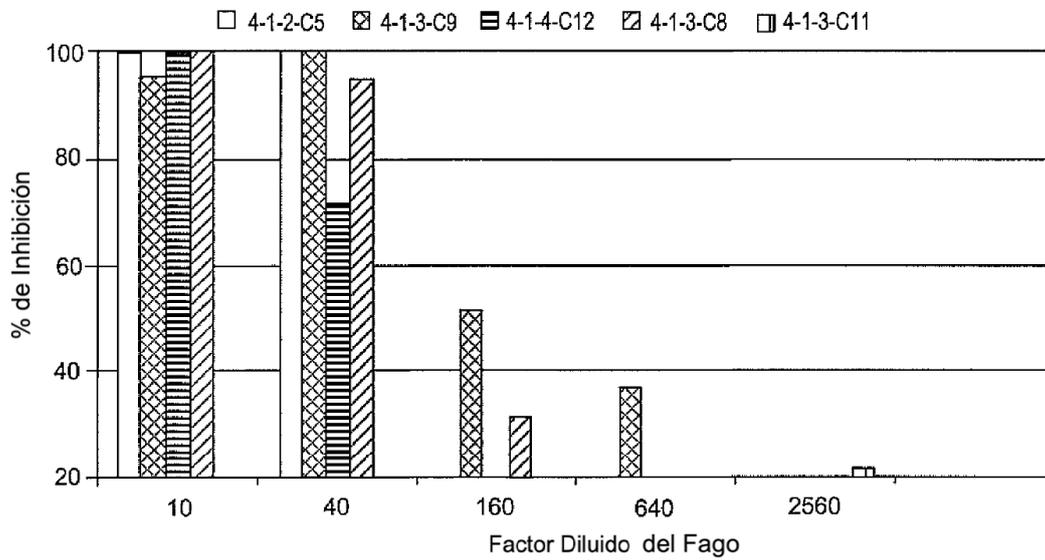


FIGURA 9B

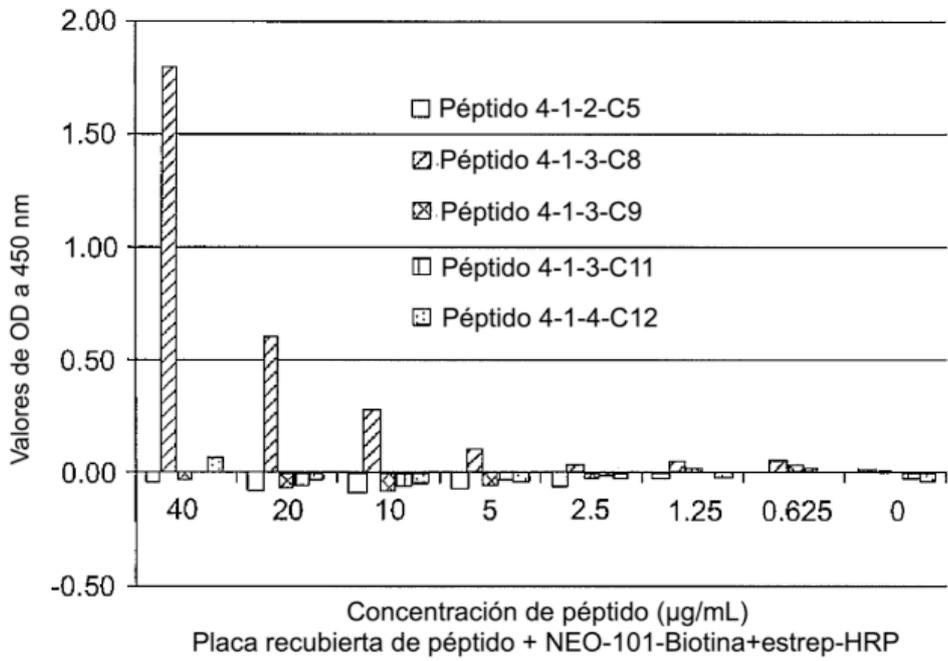


FIGURA 10

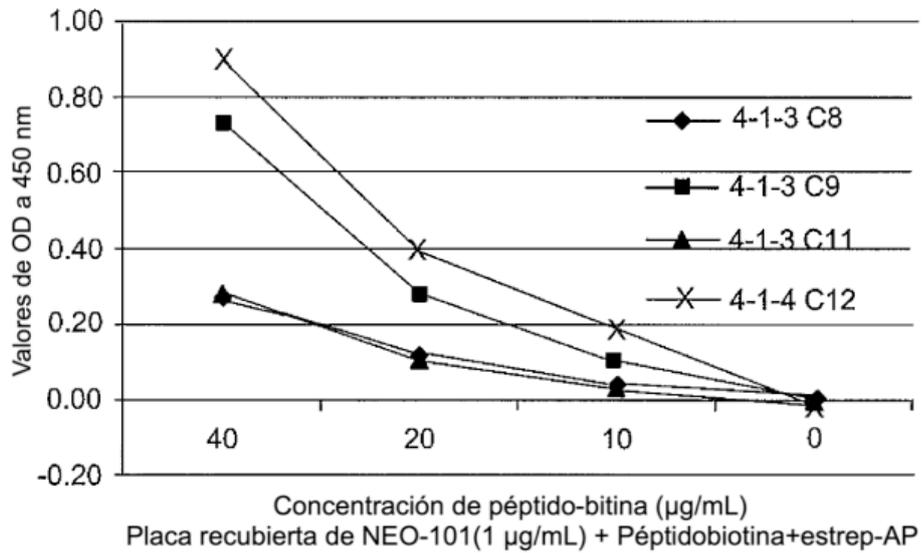


FIGURA 11

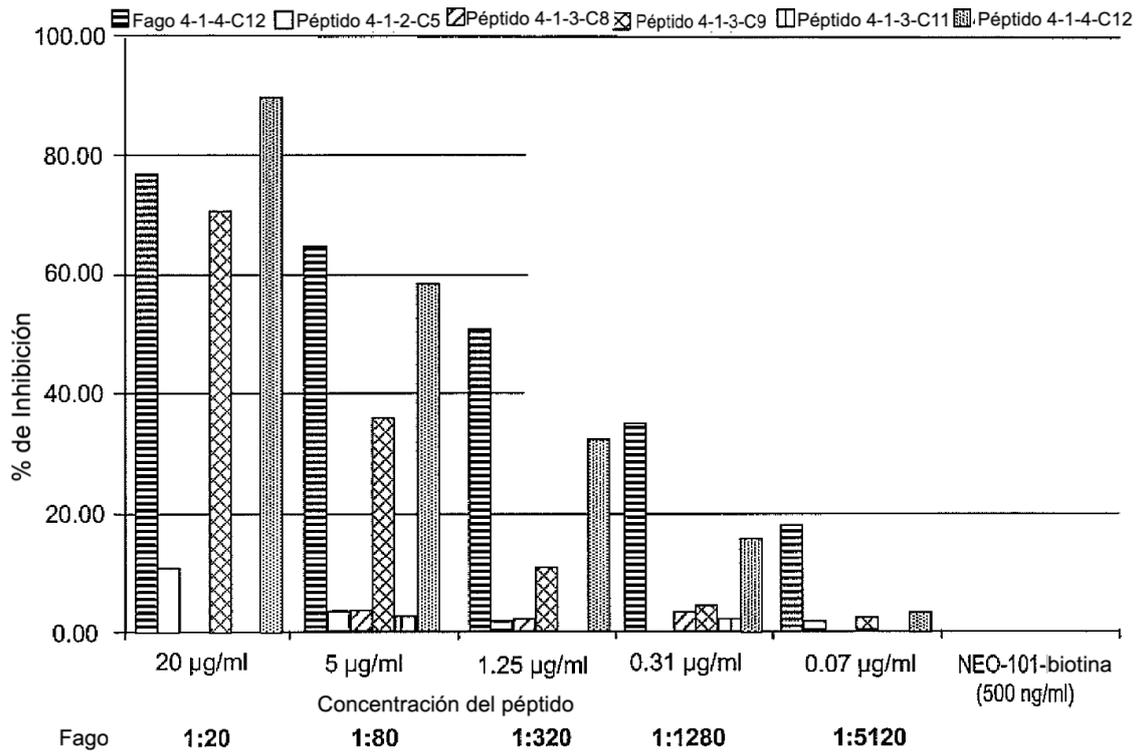


FIGURA 12

ES 2 719 624 T3

Corto	1	tthsqpvtrd	chlrcr	Wtkw	fdvdfpspgp	Hggdketynn	iirsgekicr
4-1-3-C9	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
4-1-4-C12	1	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Corto	51	rpeeitrlqc	rae	SHPEVSI	Eh1GQvvqcs	reeglvcrnq	dqqgpFKmcL
4-1-3-C9	1	-----	---	FPE---	DY-----	-----	-----FRY-T
4-1-4-C12	1	-----	---	SLPD---	DW-----	-----	-----FRY-I
Corto	101	NYE	vrvlcce	tpkgcp	VTSt	pvtapstp	(SEQ ID NO: 41)
4-1-3-C9	10	NQK	-----	-----	-----	-----	(SEQ ID NO: 4)
4-1-4-C12	11	NY	-----	-----	-----	-----	(SEQ ID NO: 5)

FIGURA 13

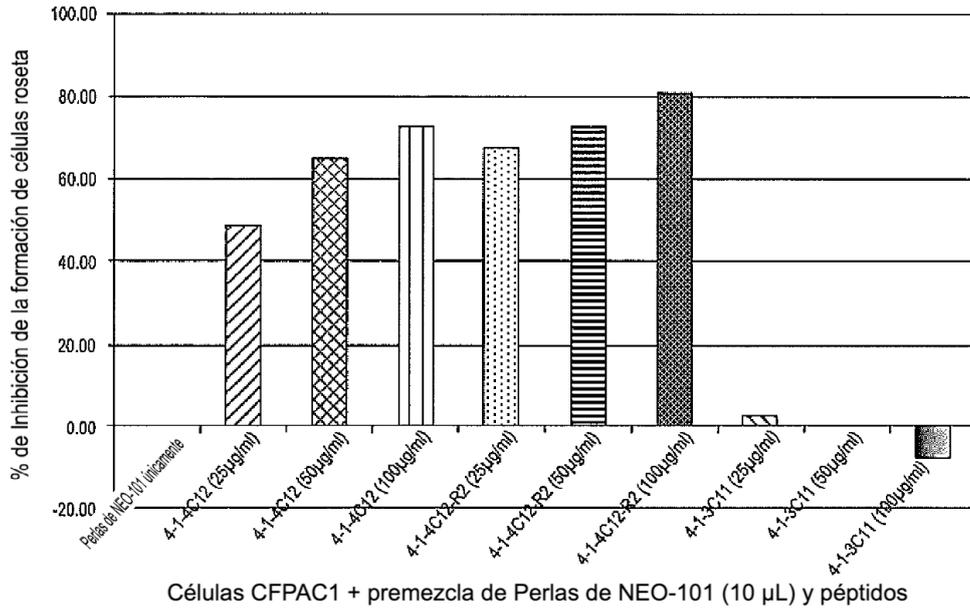


FIGURA 14A

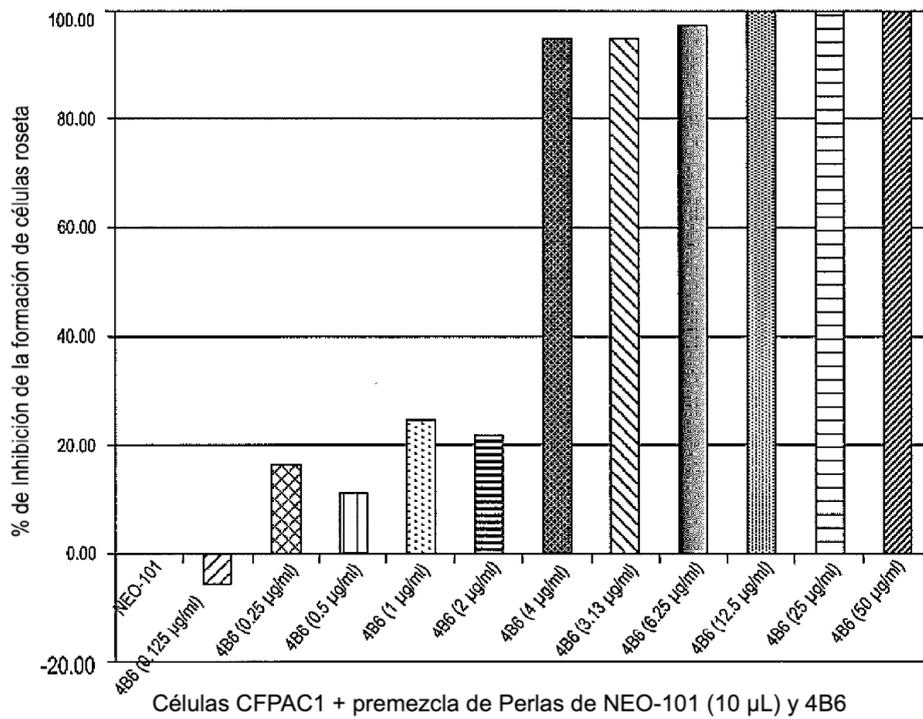


FIGURA 14B

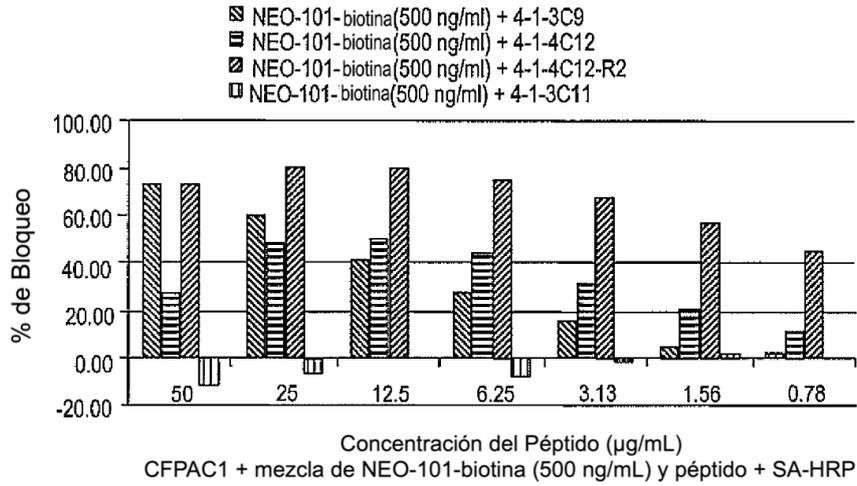


FIGURA 15A

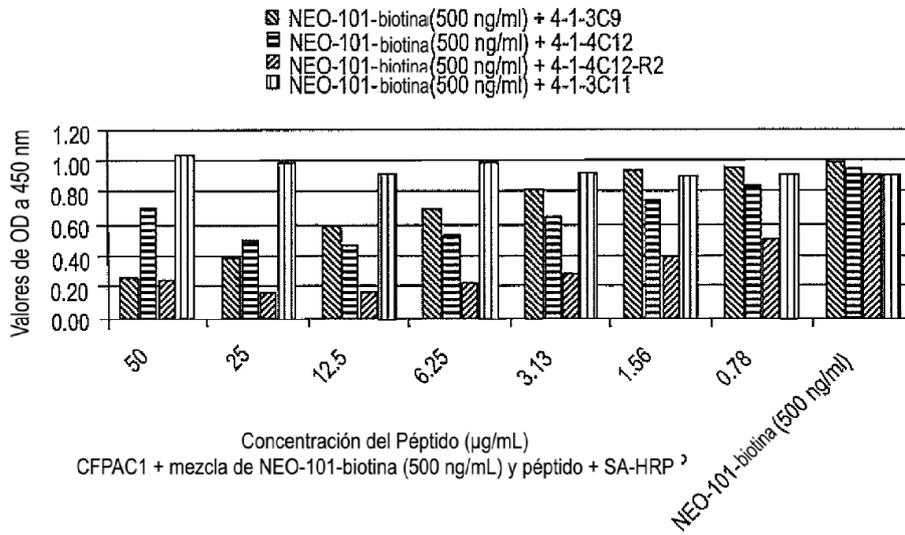


FIGURA 15B

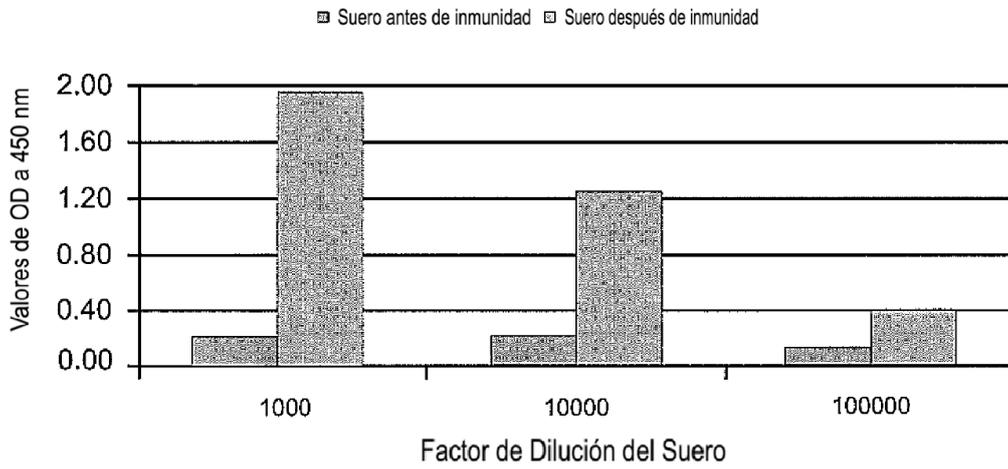


FIGURA 16A

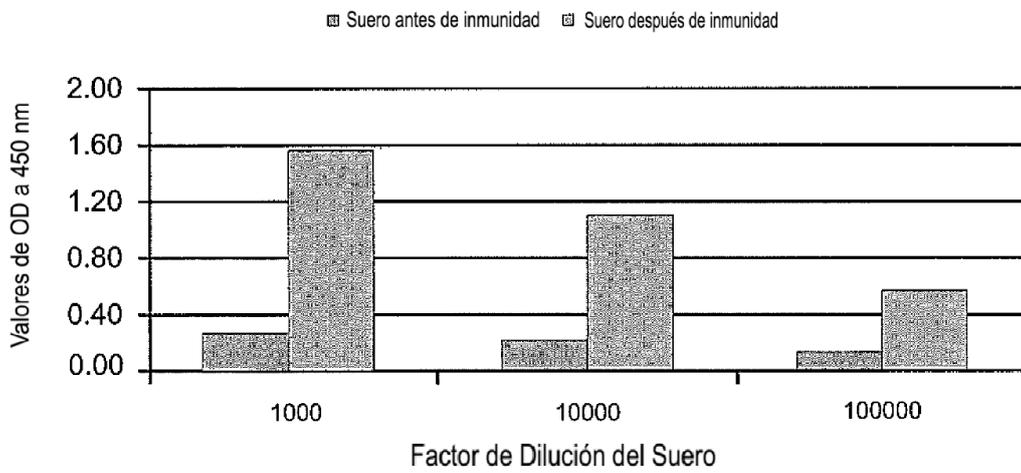


FIGURA 16B

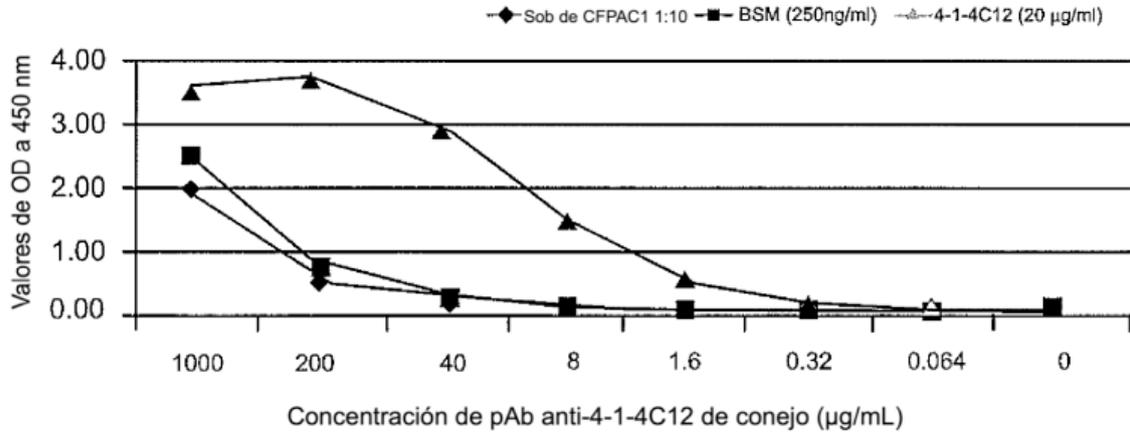


FIGURA 17

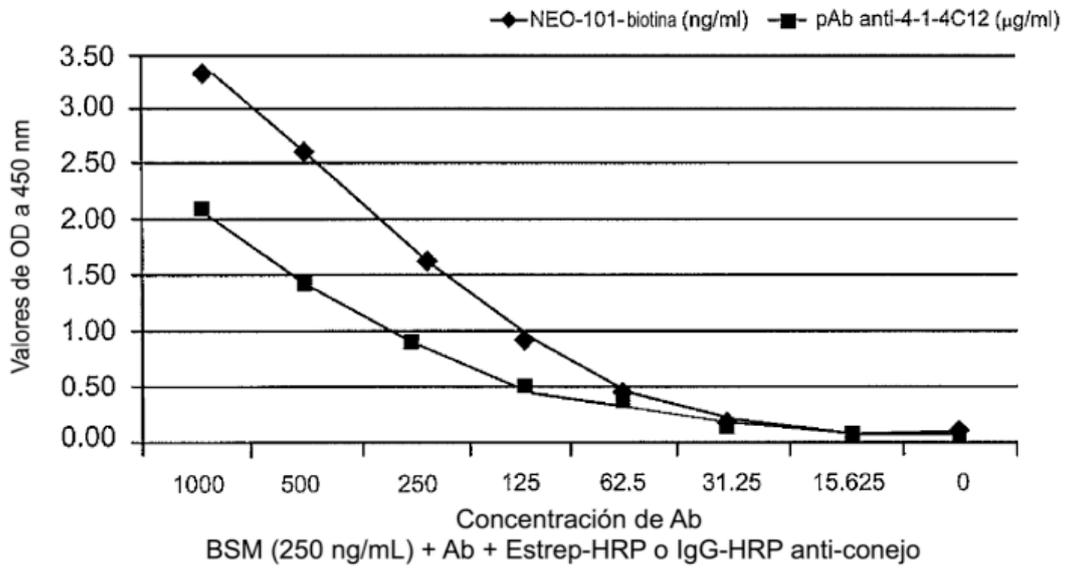


FIGURA 18