

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 788 457**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.10.2010 PCT/US2010/053686**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2011 WO11050242**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.10.2010 E 10825726 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.02.2020 EP 2490720**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo anti-GCC y composiciones y métodos relacionados**

30 Prioridad:

23.10.2009 US 254474 P

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

21.10.2020

73 Titular/es:

**MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. (50.0%)
40 Landsdowne Street
Cambridge, MA 02139, US y
AMGEN BRITISH COLUMBIA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**NAM, SAMUEL, S.;
GREENFIELD, EDWARD, A.;
BABCOOK, JOHN;
O'KEEFE, THERESA y
QIN, SHIXIN**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 788 457 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

Moléculas de anticuerpo anti-GCC y composiciones y métodos relacionados

5 Solicitudes relacionadas

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos con n.º de serie 61/254.474, presentada el 23 de octubre de 2009.

10 Campo de la invención

La invención se refiere a moléculas de anticuerpo que se unen a GCC, así como a moléculas relacionadas, por ejemplo, ácidos nucleicos que codifican dichas moléculas de anticuerpo, composiciones y métodos relacionados, por ejemplo, métodos terapéuticos y de diagnóstico.

15 Antecedentes

La guanililo ciclasa (GCC) es un receptor transmembrana de la superficie celular que funciona en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular, véase, por ejemplo, Carrithers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100:3018-3020 (2003). GCC se expresa en las células mucosas que revisten el intestino delgado, el intestino grueso y el recto (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996)). La expresión de GCC se mantiene tras la transformación neoplásica de las células epiteliales intestinales, con expresión en todos los tumores colorrectales primarios y metastásicos (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology 107: 1653-1661(1994)).

25 Sumario

La materia objeto para la que se persigue la protección es como se define en las reivindicaciones. Los inventores han descubierto numerosos anticuerpos anti-GCC, incluyendo anticuerpos tanto humanos como murinos. Por consiguiente, en un aspecto, la invención presenta una molécula de anticuerpo anti-GCC, como se divulga en el presente documento. Las moléculas de anticuerpo anti-GCC son útiles como moléculas de anticuerpo desnudas y como componentes de inmunoconjugados. Por consiguiente, en otro aspecto, la invención presenta inmunoconjugados que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente o marcador terapéutico. La invención también presenta composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de anticuerpo anti-GCC e inmunoconjugados descritos en el presente documento. La invención también presenta métodos de uso de las moléculas de anticuerpo anti-GCC y los inmunoconjugados descritos en el presente documento para la detección de GCC y de células o tejidos que expresan GCC; para el diagnóstico, pronóstico, obtención de imágenes o determinación del estadio de una enfermedad mediada por GCC; para modular una actividad o función de una proteína GCC; y para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por GCC, como se describe en el presente documento. En otro aspecto, la invención también presenta ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican secuencias de aminoácidos de moléculas de anticuerpo anti-GCC, así como vectores y células hospedadoras que comprenden dichos ácidos nucleicos y métodos para producir moléculas de anticuerpo anti-GCC.

45 Otras características, objetos y ventajas de la o las invenciones divulgadas en el presente documento serán evidentes a partir de la descripción y los dibujos y de las reivindicaciones.

Descripción de las figuras

50 La figura 1 representa el crecimiento tumoral en ratones SCID portadores de 293-GCC n.º 2 tratados con 5F9vc-MMAF, -DM1 y -DM4 en una pauta q14d.

La figura 2 representa el peso pulmonar de ratones tratados con NaCl al 0,9 %; anticuerpo 209 a 40 mg/kg; o anticuerpo 5F9 a 10 o 40 mg/kg en el día 41 p.o.

55 La figura 3 representa la curva de supervivencia de ratones portadores de tumores CT26-hGCC tratados con anticuerpo 5F9.

60 La figura 4 representa ensayos de unión de ELISA para evaluar la reactividad cruzada del anticuerpo con ortólogos de GCC.

Descripción detallada

Guanililo ciclasa C

65 La guanililo ciclasa C (GCC) (también conocida como STAR, receptor de ST, GUC2C y GUCY2C) es un receptor

transmembrana de la superficie celular que funciona en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular (Carrithers et al., Proc Natl Acad Sci USA 100: 3018-3020 (2003); Mann et al., Biochem Biophys Res Commun 239: 463-466 (1997); Pitari et al., Proc Natl Acad Sci USA 100: 2695-2699 (2003)); n.º de referencia de GenBank NM_004963). Esta función está mediada por la unión de la guanilina (Wiegand et al. FEBS Lett. 311:150-154 (1992)). GCC también es un receptor para la enterotoxina estable al calor (ST, por ejemplo, que tiene una secuencia de aminoácidos de NTFYCCELCCNPACAGCY, SEQ ID NO: 316) que es un péptido producido por *E. coli*, así como otros organismos infecciosos (Rao, M.C. Ciba Found. Symp. 112:74-93 (1985); Knoop F.C. y Owens, M. J. Pharmacol. Toxicol. Methods 28:67-72 (1992)). La unión de ST a GCC activa una cascada de señales que da como resultado una enfermedad entérica, por ejemplo, diarrea.

10

La secuencia de nucleótidos de GCC humana (n.º de referencia de GenBank NM_004963):

```

1      atgaagacgt tgctgttgga cttggctttg tggcactgc tctccagcc cgggtggctg
61     tccttagt  cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg
121    atgatgggca actcagcctt tgcaagccc ctgaaaaact tggagatgc ggtgaatgag
181    gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct
241    actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt
301    gaaggcctcg acctactcag gaaaattca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata
361    gggccctcat gtacatactc cacctccag atgtacctg acacagaatt gagctacccc
421    atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg
481    atgtctccag ctagaaagt  gatgtacttc ttggtaact tttggaaaac caacgatctg
541    ccctcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag
601    gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaacte
661    ggctttaagg tgggtttaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac
    
```

ES 2 788 457 T3

721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt
781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac
841 tttgaggaca atgtcacagc cctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgetgtct
901 cctgggaatt cccttctaaa tagctctttc tccaggaatc taccaccaac aaaacgagac
961 tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt
1021 gaaaatggag aaaatattac cacccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt
1081 gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactggggggg atgttgacag taccatgggtg
1141 ctctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgataccac
1201 gtaaataaga cctatcctgt ggatagagc cccacattca ctggaagaa ctctaaactt
1261 cctaatagata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact
1321 ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgtc ctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat
1381 tatgaacttc gtcagaaaaa atggtccac atctctctg aaaatatctt tcctctggag
1441 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc
1501 cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac
1561 aatgatggta atttcactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac
1621 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat ctctgggggtg
1681 atagaatact gtgagagagg atccctccg gaagtttaa atgacacaat ttctaccct
1741 gatggacat tcatggattg ggagttaaag atctctgtct tgotatgacat tgctaaggga
1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggc gctgaaatc taccaactgc
1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct
1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa
1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tctgctggaa agaaaccttc
2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagatttca gactggaaaa ttccaatgga
2101 atgaaacct tccgccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg
2161 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga ttcaaaaaa
2221 atfgagacta cacttgccaa gatatttggg ctttttcatg accaaaaaaa tgaagctat

ES 2 788 457 T3

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag
2341 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg
2401 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat
2461 gaggaagta caatctactt cagtgcatt gtaggttca ctactatctg caaatacagc
2521 acccccatgg aagtgggga catgcttaat gacatctata agagtttga ccacattgtt
2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcgggtgatg cgtacatggg ggctagtggg
2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc
2701 ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttctctg gcctcccaat atggatctgc
2761 attggagttc actctgggcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat
2821 tgtctatttg gagatacggg caacacagcc tctagatgg aatccactgg cctccctttg
2881 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt
2941 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg
3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag
3061 cgtttgcaag cagaatttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca
3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac
3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatfff aa

(SEQ ID NO: 227)

5 La secuencia de aminoácidos de GCC humana (n.º de referencia de GenPept NP_004954):

1 mktllldlal wllfqpgwl sfssqvsqnc hngsyaisvl mmgnsafaep lknledavne
61 gleivrgrlq naglnvtvna tfmysdglh nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli
121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwkndl
181 pftkyswsts yvykngtete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrkdq efqdilmhdn
241 rksnviimeg gpelfyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
301 pgnslnssf srnlspkrd falaylngil lfghtmlkifl engenittpk fahafmltf

361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms pftfwknskl
 421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
 481 tnetnhvslk idddkrrdti qlrlqckydk krvilkdllkx ndgnftekqk ielnkllqid
 541 yynltkfygt vkldtmifgv icycerslrv evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
 601 msylhsskte vhgrrkstnc vvdsrmvcki tdfgensilp pkkdlwtape hlrqanisqk
 661 gdvysygiia qeiilrketf ytlscrdrne kifrvensng mkpfrpdlfl etaeekelev
 721 yllvkncwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql yrsnlehlve
 781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvpeply eevtiyfsdi vgfittickys
 841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lprkngnrha idiakmalei
 901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvvgikmpyrl clfgdtvnta srmestglpl
 961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
 1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprrv asykkgtley lqlnttdkes tyf

(SEQ ID NO: 228)

5 La proteína GCC tiene algunos dominios generalmente aceptados, cada uno de los cuales contribuye a una función separable de la molécula de GCC. Las porciones de GCC incluyen una secuencia de señal (para dirigir la proteína a la superficie celular) desde el resto de aminoácido 1 a aproximadamente el resto 23 o del resto 1 a aproximadamente el resto 21 de la SEQ ID NO: 228 (cortado por maduración para dar proteína madura funcional desde los restos de aminoácido 22 o 24 a 1073 de la SEQ ID NO: 228), un dominio extracelular para el ligando, por ejemplo, guanilina o
 10 ST, que se une de aproximadamente el resto de aminoácido 24 a aproximadamente el resto 420 o de aproximadamente el resto 54 a aproximadamente el resto 384 de la SEQ ID NO: 228, un dominio transmembrana de aproximadamente el resto de aminoácido 431 a aproximadamente el resto 454 o de aproximadamente el resto 436 a aproximadamente el resto 452 de la SEQ ID NO: 228, un dominio de homología de cinasa, que se predice que tiene actividad tirosina cinasa desde aproximadamente el resto de aminoácido 489 a aproximadamente el resto 749 o de
 15 aproximadamente el resto 508 a aproximadamente el resto 745 de la SEQ ID NO: 228 y un dominio catalítico de guanililo ciclasa desde aproximadamente el resto 750 hasta aproximadamente el resto 1007 o de aproximadamente el resto 816 a aproximadamente el resto 1002 de la SEQ ID NO: 228.

20 En los tejidos humanos normales, GCC se expresa en las células mucosas, por ejemplo, en las membranas apicales de borde en cepillo, que revisten el intestino delgado, el intestino grueso y el recto (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996)). La expresión de GCC se mantiene tras la transformación neoplásica de las células epiteliales intestinales, con expresión en todos los tumores colorrectales primarios y metastásicos (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology 107: 1653-1661(1994)). Las células neoplásicas del estómago, el esófago y la unión gastroesofágica también expresan
 25 GCC (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.767.704; Debruyne et al. Gastroenterology 130:1191-1206 (2006)). La expresión específica en tejido y su asociación con el cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal, (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de estómago o cáncer de esófago), pueden aprovecharse para el uso de GCC como marcador diagnóstico para esta enfermedad (Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005)).

30 Como proteína de la superficie celular, GCC también puede servir como diana terapéutica para proteínas de unión a receptor, tales como anticuerpos o ligandos. En el tejido intestinal normal, GCC se expresa en el lado apical de las uniones estrechas de células epiteliales que forman una barrera impermeable entre el ambiente luminal y el compartimento vascular (Almenoff et al., Mol Microbiol 8: 865-873); Guarino et al., Dig Dis Sci 32: 1017-1026 (1987)).
 35 Como tal, la administración intravenosa sistémica de un agente terapéutico proteico de unión a GCC tendrá un efecto mínimo en los receptores de GCC intestinales, mientras que tiene acceso a células neoplásicas del sistema

gastrointestinal, incluyendo células de cáncer de colon invasivas o metastásicas, tumores de colon extraintestinales o metastásicos, tumores esofágicos o tumores de estómago, adenocarcinoma en la unión gastroesofágica. Además, GCC se internaliza mediante endocitosis mediada por receptor tras la unión al ligando (Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., Biochem Biophys Acta 1245: 29-36 (1995)).

5 Los anticuerpos policlonales generados contra el dominio extracelular de GCC (Nandi et al. Protein Expr. Purif. 8:151-159 (1996)) fueron capaces de inhibir la unión del péptido ST a GCC humana y de rata e inhiben la producción de GMPc mediada por ST por GCC humana.

10 GCC se ha caracterizado como una proteína implicada en cánceres, incluyendo cánceres de colon. Véase también, Carrithers et al., Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. Eur J Cancer 41: 1618-1627 (2005); Carrithers et al., Gastroenterology 107: 1653-1661(1994); Urbanski et al., Biochem Biophys Acta 1245: 29-36 (1995). Pueden usarse agentes terapéuticos de moléculas de anticuerpo dirigidos contra GCC solos o en forma no conjugada para inhibir de este modo las células cancerosas que expresan GCC. Las moléculas de anticuerpo anti-GCC de la invención pueden unirse a GCC humana. En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede inhibir la unión de un ligando, por ejemplo, guanililo o enterotoxina termoestable a GCC. En otras realizaciones, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención no inhibe la unión de un ligando, por ejemplo, guanililo o enterotoxina termoestable a GCC.

20 Los anticuerpos monoclonales específicos para GCC incluyen GCC:B10 (Nandi et al., J. Cell. Biochem. 66:500-511 (1997)), GCC:4D7 (Vijayachandra et al. Biochemistry 39:16075-16083 (2000)) y GCC:C8 (Bakre et al. Eur. J. Biochem. 267:179-187 (2000)). GCC:B10 tiene una cadena ligera kappa y un isotipo IgG2a y reacciona de manera cruzada con GCC de rata, de cerdo y de mono. GCC:B10 se une a los primeros 63 aminoácidos del dominio intracelular de GCC, específicamente a los restos 470-480 de la SEQ ID NO: 228 (Nandi et al. Protein Sci. 7:2175-2183 (1998)). GCC:4D7 se une al dominio de homología de cinasa, entre los restos 491-568 de GCC (Bhandari et al. Biochemistry 40:9196-9206 (2001)). GCC:C8 se une al dominio similar a proteína cinasa en la porción citoplasmática de GCC.

Definiciones y métodos

30 Salvo que se definan de otra forma en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en relación con la presente invención tienen los significados que se entienden comúnmente por los expertos habituales en la materia. En general, la nomenclatura utilizada en relación con y las técnicas de, cultivo celular y cultivo de tejidos, biología molecular y química de proteínas y oligo o polinucleótidos y de hibridación descritas en el presente documento son las conocidas por los expertos en la materia. Los números de referencia de GenBank o GenPept y las secuencias de ácido nucleico y péptido útiles pueden encontrarse en la página web mantenida por el National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD. Se usan técnicas convencionales para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo, transformación y transfección de tejidos (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se lleva a cabo comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Las técnicas y procedimientos anteriores se llevan a cabo generalmente de acuerdo con métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en diversas referencias generales y más específicas que se citan y analizan a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) o véase, en general, Harlow, E. y Lane, D. (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Las nomenclaturas utilizadas en conexión con y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica sintética y química médica y farmacéutica que se describen en el presente documento son las conocidas en la técnica. Se usan técnicas convencionales para las síntesis químicas, los análisis químicos, la preparación farmacéutica, la formulación y el suministro y el tratamiento de pacientes. Además, a no ser que el contexto requiera otra cosa, los términos en singular incluirán las pluralidades y los términos en plural incluirán el singular.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo, péptidos de anticuerpo o inmunoglobulina o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores, por ejemplo, de un anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo incluyen moléculas de anticuerpo monocatenarias, por ejemplo, scFv, véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883) y moléculas de anticuerpo de un solo dominio, véase, por ejemplo, el documento WO9404678. Aunque no se encuentran dentro del término "moléculas de anticuerpo", la invención también incluye "análogos de anticuerpo", armazones a base de proteínas distintos de anticuerpos, por ejemplo, proteínas de fusión y/o inmunoconjugados que usan CDR para proporcionar unión específica al antígeno.

60 Una "molécula de anticuerpo anti-GCC" se refiere a una molécula de anticuerpo (es decir, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o análogo de anticuerpo) que interactúa con o reconoce, por ejemplo, se une (por ejemplo, se une específicamente) a GCC, por ejemplo, GCC humana. Las moléculas de anticuerpo anti-GCC ejemplares son como las resumidas en las tablas 1 y 2.

65 Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo", "péptido de anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a proteínas y glucoproteínas monocatenarias, bicatenarias y multcatenarias. El término anticuerpo incluye anticuerpos

5 policlonales, monoclonales, quiméricos, con CDR injertadas y humanos o humanizados, todos los cuales se analizan con más detalle en otras partes del presente documento. En el término también se incluyen anticuerpos de camélido, véase, por ejemplo, el documento US2005/0037421 y nanocuerpos, por ejemplo, IgNAR (anticuerpos de tiburón), véase, por ejemplo, el documento WO03/014161. El término "anticuerpo" también incluye variantes sintéticas y modificadas por ingeniería genética.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere, por ejemplo, a fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos funcionales de cadena pesada (nanocuerpos), así como cualquier porción de un anticuerpo que tiene especificidad contra al menos un epítipo deseado, que compite con el anticuerpo intacto por la unión específica (por ejemplo, un fragmento que tiene suficientes secuencias CDR y que tiene suficientes secuencias marco para unirse específicamente a un epítipo). Por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno puede competir por la unión a un epítipo al que se une el anticuerpo del que procede el fragmento. Derivado, como se usa en este contexto y otros similares, no implica cualquier método o proceso de derivación particular, pero puede referirse sencillamente a similitud de secuencia. Pueden producirse fragmentos de unión a antígeno mediante técnicas recombinantes o mediante escisión enzimática o química de un anticuerpo intacto. La expresión, fragmento de unión a antígeno, cuando se usa con una sola cadena, por ejemplo, una cadena pesada, de un anticuerpo que tiene una cadena ligera y una pesada, significa que el fragmento de la cadena es suficiente, de tal forma que cuando se empareja con una región variable completa de la otra cadena, por ejemplo, la cadena ligera, permitirá la unión de al menos un 25, 50, 75, 85 o 90 % de la observada con la región variable de cadena pesada y ligera).

20 La expresión, "constelación de CDR de unión a antígeno" o "un número de CDR suficiente para permitir la unión" (y expresiones similares), como se usa en el presente documento, se refiere a suficientes CDR de una cadena, por ejemplo, la cadena pesada, de tal forma que cuando se pone en un armazón y se empareja con una región variable completa de la otra cadena o con una porción de la región variable de la otra cadena de una longitud similar y que tenga el mismo número de CDR, por ejemplo, la cadena ligera, permitirá la unión, por ejemplo, de al menos un 25, 50, 75, 85 o 90 % de la observada con la región variable de cadena pesada y ligera.

25 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que posee una secuencia que procede de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como un anticuerpo procedente de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones modificados por ingeniería genética XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, CA)), bibliotecas de presentación en fagos humanos, células de mieloma humanas o linfocitos B humanos.

30 Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que procede de un anticuerpo no humano, por ejemplo, de roedor (por ejemplo, murino) que conserva o conserva sustancialmente las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo precursor, pero que es menos inmunogénico en seres humanos. Humanizado, como se utiliza en el presente documento, pretende incluir anticuerpos desinmunizados. Normalmente, los anticuerpos humanizados incluyen CDR no humanas y regiones marco y constantes humanas o derivadas de humano.

35 La expresión anticuerpo "modificado", como se usa en el presente documento, se refiere a anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedadora, anticuerpos aislados de una biblioteca combinatoria de anticuerpo recombinante, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón, oveja o cabra) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humanos o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana en otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos modificados incluyen anticuerpos humanizados, con CDR injertadas (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDR de un primer anticuerpo y una región marco de una fuente diferente, por ejemplo, un segundo anticuerpo o un armazón consenso), quiméricos, generados *in vitro* (por ejemplo, mediante presentación en fagos) y puede incluir opcionalmente regiones variables o constantes procedentes de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobulina humanos o anticuerpos que se han preparado, expresado, creado o aislado por cualquier medio que implique el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana con secuencias de inmunoglobulina alternativas. En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo modificada incluye una molécula de anticuerpo que tiene un cambio de secuencia respecto de un anticuerpo de referencia.

40 La expresión "anticuerpo mono-específico" se refiere a un anticuerpo o una preparación de anticuerpos que muestra una sola especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. Esta expresión incluye un "anticuerpo monoclonal" o una "composición de anticuerpo monoclonal".

45 La expresión "anticuerpo biespecífico" o "anticuerpo bifuncional" se refiere a un anticuerpo que muestra especificidad de unión dual para dos epítipos, donde cada sitio de unión es diferente y reconoce un epítipo diferente.

50 Las expresiones "anticuerpo no conjugado" y "anticuerpo desnudo" se usan indistintamente para hacer referencia a una molécula de anticuerpo que no está conjugada a un resto distinto de un anticuerpo, por ejemplo, un agente

terapéutico o un marcador.

Los términos "inmunoconjugado", "conjugado de anticuerpo", "conjugado de anticuerpo-fármaco" y "ADC" se usan indistintamente y se refieren a un anticuerpo que se conjuga a un resto distinto de un anticuerpo, por ejemplo, un agente terapéutico o un marcador.

El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica o un extracto hecho de materiales biológicos. La expresión "agente terapéutico" se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

La expresión "agente anticáncer" o "agente quimioterapéutico" se usa en el presente documento para hacer referencia a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir el desarrollo o la progresión de una neoplasia en un ser humano, particularmente una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma o leucemia. La inhibición de la metástasis o la angiogénesis es frecuentemente una propiedad de los agentes anticancerosos o quimioterapéuticos. Un agente quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. La expresión "agente citostático" se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células.

Los "agentes citotóxicos" se refieren a compuestos que provocan muerte celular, principalmente interfiriendo directamente con el funcionamiento de la célula, incluyendo, pero sin limitación, agentes alquilantes, Inhibidores del factor de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de cinasa, inhibidores de proteasoma e inhibidores de topoisomerasa. Una "carga tóxica", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se administra a una célula, causa muerte celular. El suministro de una carga tóxica puede lograrse mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención y un agente citotóxico. El suministro de una carga tóxica también puede lograrse mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo secundario o un fragmento de unión a antígeno del mismo que reconoce y se une a un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención.

Como se usa en el presente documento, la frase, una secuencia "procedente de" o "específica para una secuencia indicada" se refiere a una secuencia que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6 nucleótidos o de al menos 2 aminoácidos, al menos aproximadamente 9 nucleótidos o al menos 3 aminoácidos, al menos aproximadamente 10-12 nucleótidos o 4 aminoácidos o al menos aproximadamente 15-21 nucleótidos o 5-7 aminoácidos, correspondiente, es decir, idéntica o complementaria a, por ejemplo, una región contigua de la secuencia indicada. En ciertas realizaciones, la secuencia comprende la totalidad de una secuencia de nucleótidos o aminoácidos indicada. La secuencia puede ser complementaria (en el caso de una secuencia de polinucleótidos) o idéntica a una región de secuencia que es única para una secuencia particular, como se determina mediante técnicas conocidas en la técnica. Las regiones de las que pueden proceder las secuencias, incluyen, pero sin limitación, regiones que codifican epítopos específicos, regiones que codifican CDR, regiones que codifican secuencias marco, regiones que codifican regiones de dominio constante, regiones que codifican regiones de dominio variable, así como regiones no traducidas y/o no transcritas. La secuencia derivada no se derivará necesariamente físicamente de la secuencia de interés que se está estudiando, pero puede generarse de cualquier manera, incluyendo, pero sin limitación, síntesis química, replicación, retrotranscripción o transcripción, que se basa en la información proporcionada por la secuencia de bases en las regiones de las que procede el polinucleótido. Como tal, puede representar una orientación sentido o antisentido del polinucleótido original. Además, pueden modificarse combinaciones de regiones correspondientes a las de la secuencia indicada o combinarse de maneras conocidas en la técnica como consistentes con el uso previsto. Por ejemplo, una secuencia puede comprender dos o más secuencias contiguas, comprendiendo cada una parte de una secuencia indicada y se interrumpen con una región que no es idéntica a la secuencia indicada pero está pensada para representar una secuencia derivada de la secuencia indicada. Con respecto a las moléculas de anticuerpo, "derivado de las mismas" incluye una molécula de anticuerpo que está relacionada funcional o estructuralmente con un anticuerpo de comparación, por ejemplo, "derivado de las mismas" incluye una molécula de anticuerpo que tiene similar o sustancialmente la misma secuencia o estructura, por ejemplo, que tiene las mismas o similares regiones CDR, marco o variables. "Derivado de las mismas" para un anticuerpo también incluye restos, por ejemplo, uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más restos, que pueden ser o no contiguos, pero que se definen o identifican de acuerdo con un esquema de numeración o de homología respecto de una estructura de anticuerpo general o proximidad tridimensional, es decir, en una región CDR o marco, de una secuencia de comparación. La expresión "derivada de la misma" no se limita a físicamente derivada de la misma, pero incluye la generación por cualquier modo, por ejemplo, mediante el uso de información de secuencia de un anticuerpo de comparación para diseñar otro anticuerpo.

Como se usa en el presente documento, la frase "codificado por" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de polipéptido, en donde la secuencia de polipéptido o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos 3 a 5 aminoácidos, al menos 8 a 10 aminoácidos o al menos 15 a 20 aminoácidos respecto de un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico.

Pueden llevarse a cabo cálculos de "homología" entre dos secuencias como se expone a continuación. Se alinean las secuencias con fines comparativos óptimos (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera

y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para un alineamiento óptimo, y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines comparativos). La longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, 40 % o 50 %, al menos un 60 % o al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los restos de aminoácido o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácido o ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias puede lograrse usando un algoritmo matemático. El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970), que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete informático GCG, usando o bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250 y una ponderación por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. El porcentaje de homología entre dos secuencias de nucleótidos también puede determinarse usando el programa GAP en el paquete informático GCG (Accelrys, Inc. San Diego, CA), usando una matriz NWSgapdna.CMP y una ponderación por hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y una ponderación por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto ejemplar de parámetros para la determinación de la homología es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por hueco extendido de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento de fase de 5.

Como se usa en el presente documento, la expresión "hibrida en condiciones rigurosas" describe condiciones de hibridación y lavado. Puede encontrarse orientación para llevar a cabo las reacciones de hibridación en Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esta referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y puede usarse cualquiera de los dos. Las condiciones de hibridación específicas citadas en el presente documento son 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 SSC 0,2X, SDS al 0,1 % al menos a 50 °C (la temperatura de los lavados puede aumentarse a 55 °C para las condiciones de baja rigurosidad); 2) condiciones de hibridación de rigurosidad media en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 60 °C; 3) condiciones de hibridación de rigurosidad elevada en SSC 6X a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1 % a 65 °C; y 4) condiciones de hibridación de muy alta rigurosidad son fosfato de sodio 0,5M, SDS al 7 % a 65 °C, seguida de uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 1 % a 65 °C. Normalmente, las condiciones de muy alta rigurosidad (4) son las condiciones preferidas y las que deben usarse a menos que se especifique otra cosa.

Se entiende que los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos de la invención pueden tener sustituciones de aminoácidos adicionales conservativas o no esenciales, que no tienen un efecto sustancial en las funciones del polipéptido. Que se tolere o no una sustitución particular, es decir, que no afecte adversamente a las propiedades fisiológicas deseadas, tales como la actividad de unión, puede determinarse como se describe en Bowie, JU et al. Science 247:1306-1310 (1990) o Padlan et al. FASEB J. 9:133-139 (1995). Una "sustitución de aminoácidos conservativa" es una en la que se reemplaza el resto de aminoácido por un resto de aminoácido que tenga una cadena lateral similar. Se han definido en la técnica familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta-ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

Un resto de aminoácido "no esencial" es un resto que puede alterarse con respecto a la secuencia de tipo silvestre del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin suprimir o sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que un resto de aminoácido "esencial" da como resultado dicho cambio. En un anticuerpo, un resto de aminoácido esencial puede ser un resto determinante de la especificidad (SDR).

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a un material que se extrae del ambiente original (por ejemplo, el ambiente natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal vivo no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, separado de algunos o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido puede ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido puede formar parte de una composición, por ejemplo, una mezcla, solución o suspensión o comprender una célula aislada o una célula cultivada que comprende el polinucleótido o el polipéptido y seguir estando aislado en tanto que el vector o la composición no forma parte de su ambiente natural.

Como se usa en el presente documento, el término "replicón" se refiere a cualquier elemento genético, tal como un plásmido, un cromosoma o un virus, que se comporta como una unidad autónoma de replicación de polinucleótido en

una célula.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "unido operativamente" se refiere a una situación en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar de su modo previsto. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia de control "unida operativamente" a una secuencia codificante está ligada de tal manera que se logra la expresión de la secuencia codificante en condiciones compatibles con la secuencia de control.

10 Como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a un replicón en el que se une otro segmento de polinucleótido, tal como para provocar la replicación y/o expresión del segmento acoplado.

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia de control" se refiere a una secuencia de polinucleótido que es necesaria para efectuar la expresión de una secuencia codificante a la que se liga. La naturaleza de dichas secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador. En procariontes, dichas secuencias de control incluyen generalmente un promotor, un sitio de unión ribosomal y terminadores y, en algunos casos, potenciadores. Por lo tanto, la expresión "secuencia de control" pretende incluir como mínimo todos los componentes cuya presencia sea necesaria para la expresión y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia sea ventajosa, por ejemplo, secuencias líder.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "producto purificado" se refiere a una preparación del producto que se ha aislado de los constituyentes celulares con los que normalmente se asocia el producto y/o de otros tipos de células que pueden estar presentes en la muestra de interés.

25 Como se usa en el presente documento, el término "epítopo" se refiere a un determinante de proteína capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. Los determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupamientos de superficie químicamente activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y normalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Algunos epítomos son epítomos lineales, mientras que otros son epítomos conformacionales. Un epítopo lineal es un epítopo en donde una secuencia de aminoácidos contigua comprende el epítopo reconocido. Un epítopo lineal normalmente incluye al menos 3 y más normalmente, al menos 5, por ejemplo, de aproximadamente 8 a 30 aproximadamente 10 aminoácidos contiguos. Un epítopo conformacional puede ser el resultado de al menos dos situaciones, tales como: a) una secuencia lineal que solo se expone a la unión del anticuerpo en ciertas conformaciones de la proteína, por ejemplo, dependientes de la unión de ligando o dependientes de modificaciones (por ejemplo, fosforilación) por moléculas de señalización; o b) una combinación de características estructurales de más de una parte de la proteína o en proteínas de múltiples subunidades, de más de una subunidad, en donde las características se encuentran lo suficientemente próximas en el espacio en 3 dimensiones como para participar en la unión.

35 Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que se codifica por los genes de región constante de cadena pesada.

40 Como se usa en el presente documento, las expresiones "agente detectable", "marcador" o "marcado" se usan para hacer referencia a la incorporación de un marcador detectable en un polipéptido o glucoproteína. Se conocen en la técnica y pueden usarse diversos métodos de marcaje de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de marcadores para polipéptidos incluyen, pero sin limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, indio (¹¹¹In), yodo (¹³¹I o ¹²⁵I), itrio (⁹⁰Y), lutecio (¹⁷⁷Lu), actinio (²²⁵Ac), bismuto (²¹²Bi o ²¹³Bi), azufre (³⁵S), carbono (¹⁴C), tritio (³H), rodio (¹⁸⁸Rh), tecnecio (^{99m}Tc), praseodimio o fósforo (³²P) o un radionúclido emisor de positrones, por ejemplo, carbono-11 (¹¹C), potasio-40 (⁴⁰K), nitrógeno-13 (¹³N), oxígeno-15 (¹⁵O), flúor-18 (¹⁸F) y yodo-121 (¹²¹I)), marcadores fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos de lantánidos), marcadores enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínico (que pueden detectarse por una avidina marcada, por ejemplo, una molécula que contiene un resto de estreptavidina y un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede detectarse por medios ópticos o calorimétricos) y epítomos de polipéptidos predeterminados reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, pares de secuencia de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcadores de epítopo). En algunas realizaciones, los marcadores se unen mediante brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el posible impedimento estérico.

55 Como se usa en el presente documento, "unión específica", "se une específicamente" o "especificidad de unión" significa, para una molécula de anticuerpo anti-GCC, que la molécula de anticuerpo se une a GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana, con una afinidad mayor que a una proteína distinta de GCC, por ejemplo, BSA. Normalmente, una molécula de anti-GCC tendrá una K_d por la proteína distinta de GCC, por ejemplo, BSA, que es mayor que 2, mayor que 10, mayor que 100, mayor que 1.000 veces, mayor que 10⁴, mayor que 10⁵ o mayor que 10⁶ veces su K_d por GCC, por ejemplo, la proteína GCC humana. A la hora de determinar la K_d, la K_d por GCC y la proteína distinta de GCC, por ejemplo, BSA, deben efectuarse en las mismas condiciones.

65 Como se usa en el presente documento, el término "tratar" o "tratamiento" se define como la administración de una molécula de anticuerpo anti-GCC a un sujeto, por ejemplo, un paciente o a la administración, por ejemplo, mediante

aplicación, a un tejido o célula aislados de un sujeto que se devuelve al sujeto. La molécula de anticuerpo anti-GCC puede administrarse sola o en combinación con un segundo agente. El tratamiento puede ser para curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, paliar, mejorar o afectar al trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición a padecer el trastorno, por ejemplo, un cáncer. Aunque sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que el tratamiento causa la inhibición, ablación o eliminación de una célula *in vitro* o *in vivo* o de otro modo reducir la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, para mediar un trastorno, por ejemplo, un trastorno como se describe en el presente documento (por ejemplo, un cáncer).

Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "sujeto" incluya mamíferos, primates, humanos y animales no humanos. Por ejemplo, un sujeto puede ser un paciente (por ejemplo, un paciente humano o un paciente veterinario), que tiene un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), un síntoma de un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el que al menos algunas de las células expresan GCC o una predisposición hacia un cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal (por ejemplo, cáncer de colon), en el que al menos algunas de las células expresan GCC. La expresión "animales no humanos" de la invención incluye todos los vertebrados no humanos, por ejemplo, mamíferos no humanos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc., salvo que se indique lo contrario. En una realización, el sujeto excluye uno o más o todos de un ratón, rata, conejo o cabra.

Como se usa en el presente documento, una cantidad de una molécula de anticuerpo anti-GCC "eficaz" o "suficiente" para tratar un trastorno o una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad terapéuticamente suficiente", se refiere a una cantidad de la molécula de anticuerpo que es eficaz, tras la administración de una dosis única o múltiple a un sujeto, en el tratamiento de una célula, por ejemplo, célula cancerosa (por ejemplo, una célula tumoral que expresa GCC) o para prolongar la curación, el alivio, la mitigación o la mejora de un sujeto con un trastorno como se describe en el presente documento más allá de lo esperado en ausencia de dicho tratamiento. Como se usa en el presente documento, "inhibir el crecimiento" del tumor o cáncer se refiere a ralentizar, interrumpir, detener o parar su crecimiento y/o metástasis y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento tumoral.

Como se usa en el presente documento, "GCC", también conocida como proteína "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" o "receptor de ST" se refiere a GCC de mamífero, preferentemente la proteína GCC humana. GCC humana se refiere a la proteína mostrada en la SEQ ID NO: 228 y a variantes alélicas de la proteína de origen natural de la misma. El alelo en la SEQ ID NO: 228 puede estar codificado por la secuencia de ácido nucleico de GCC mostrada en la SEQ ID NO: 227. Se conocen en la técnica otras variantes. Véase, por ejemplo, el número de referencia Ensp0000261170, base de datos Ensembl, European Bioinformatics Institute y Wellcome Trust Sanger Institute, que tiene una leucina en el resto 281; la SEQ ID NO: 14 de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos publicada número US 20060035852; o el número de referencia de GenBank AAB19934. Normalmente, una variante alélica de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95 %, 97 % o 99 % idéntica a la secuencia de GCC de SEQ ID NO: 228. El transcrito codifica un producto de proteína de 1073 aminoácidos y se describe en el n.º de referencia de GenBank: NM_004963. La proteína GCC se caracteriza como una proteína receptora transmembrana de la superficie celular y se cree que desempeña un papel crítico en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular.

A menos que se indique otra cosa, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, *n*-propilo, iso-propilo, *n*-butilo, iso-butilo, sec-butilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-2-butilo, *n*-hexilo, *n*-heptilo, *n*-octilo, *n*-nonilo, *n*-decilo, 3-metil-2-butilo, 3-metil-1-butilo, 2-metil-1-butilo, 1-hexilo, 2-hexilo, 3-hexilo, 2-metil-2-pentilo, 3-metil-2-pentilo, 4-metil-2-pentilo, 3-metil-3-pentilo, 2-metil-3-pentilo, 2,3-dimetil-2-butilo y 3,3-dimetil-2-butilo.

Los grupos alquilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden citarse como "sustituídos". Un grupo alquilo sustituido es un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos, preferentemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado entre los halógenos), incluyendo, pero sin limitación, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈ y -alquino C₂-C₈ pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más grupos que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈ o -arilo.

A menos que se indique otra cosa, los términos "alqueno" y "alquino" se refieren a cadenas de carbono lineales o ramificadas que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en los mismos), prefiriéndose de

aproximadamente 2 a aproximadamente 8 átomos de carbono. Una cadena de alqueniilo tiene al menos un doble enlace en la cadena y una cadena de alquinilo tiene al menos un triple enlace en la cadena. Los ejemplos de grupos alqueniilo incluyen, pero sin limitación, etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo y -2,3-dimetil-2-butenilo. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen, pero sin limitación, acetilénico, propargilo, acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo y -3-metil-1-butinilo.

Al igual que con grupos alquilo, los grupos alqueniilo y alquinilo, pueden estar sustituidos. Un grupo alqueniilo o alquinilo "sustituido" es uno que está sustituido con uno o más grupos, preferentemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado entre los halógenos), incluyendo, pero sin limitación, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈ y -alquinilo C₂-C₈ pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo.

A menos que se indique otra cosa, el término "alquilenilo" se refiere a un radical hidrocarburo saturado de cadena ramificada o lineal que tiene de aproximadamente 1 a aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo), prefiriéndose de aproximadamente 1 a aproximadamente 8 átomos de carbono y teniendo dos centros radicales monovalentes derivados mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o dos átomos de carbono diferentes de un alcano precursor. Los alquilenos típicos incluyen, pero sin limitación, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, octileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno y similares. Los grupos alquilenilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente 1 a 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado entre los halógenos), incluyendo, pero sin limitación, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈ y -alquinilo C₂-C₈ pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo.

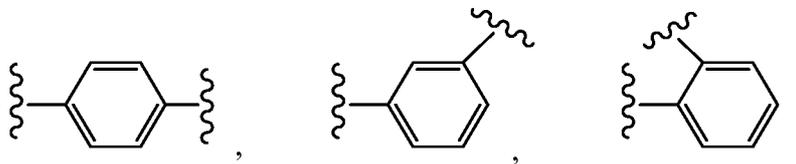
A menos que se indique otra cosa, el término "alqueniileno" se refiere a un grupo alqueniileno opcionalmente sustituido que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los grupos alqueniileno ejemplares incluyen, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH₂-).

A menos que se indique otra cosa, el término "alquinileno" se refiere a un grupo alquilenilo opcionalmente sustituido que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los grupos alquinileno ejemplares incluyen, por ejemplo, acetileno (-C≡C-), propargileno (-CH₂C≡C-) y 4-pentinilo (-CH₂CH₂CH₂C≡CH-).

A menos que se indique otra cosa, el término "arilo" se refiere a un radical hidrocarburo aromático monovalente de 6-20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números de átomos de carbono en el mismo) derivado por la retirada de un átomo de hidrógeno de un solo átomo de carbono de un sistema de anillo aromático precursor. Algunos grupos arilo se representan en las estructuras ejemplares como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen, pero sin limitación, los radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo y similares.

Un grupo arilo, ya esté solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente 1 a 5 o incluso 1 a 2 grupos que incluyen, pero sin limitación, -halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -NO₂, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈) y -arilo pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueniilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueniilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo.

A menos que se indique otra cosa, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido que es divalente (es decir, se deriva mediante la eliminación de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo aromático precursor) y puede encontrarse en las configuraciones orto, meta o para como se muestra en las siguientes estructuras, siendo fenilo el grupo arilo ejemplar:



Los grupos "-(alquilen C₁-C₈)arilo", "-(alquenilen C₂-C₈)arilo", y "-(alquinilen C₂-C₈)arilo" típicos incluyen, pero sin limitación, bencilo, 2-feniletan-1-ilo, 2-feniletan-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftiletan-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares.

A menos que se indique otra cosa, el término "heterociclo", se refiere a un sistema de anillo monocíclico, bicíclico o policíclico que tiene de 3 a 14 átomos de anillo (también citados como miembros de anillo), en donde al menos un átomo de anillo en al menos un anillo es un heteroátomo seleccionado entre N, O, P o S (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos en el mismo). El heterociclo puede tener de 1 a 4 heteroátomos de anillo seleccionados independientemente entre N, O, P o S. Uno o más átomos de N, C o S en un heterociclo pueden estar oxidados. Un heterociclo monocíclico tiene preferentemente de 3 a 7 miembros de anillo (por ejemplo, de 2 a 6 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, P o S) y un heterociclo bicíclico tiene preferentemente de 5 a 10 miembros de anillo (por ejemplo, de 4 a 9 átomos de carbono y de 1 a 3 heteroátomos seleccionados independientemente entre N, O, P o S). El anillo que incluye el heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se indique otra cosa, el heterociclo está acoplado a su grupo colgante en cualquier heteroátomo o átomo de carbono que da como resultado una estructura estable.

Los heterociclos se describen en Paquette, "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, Nueva York, 1968), en particular los Capítulos 1, 3, 4, 6, 7 y 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, Nueva York, 1950 hasta la actualidad), en particular los Volúmenes 13, 14, 16, 19 y 28; y J. Am. Chem. Soc. 82:5566 (1960).

A menos que se indique otra cosa, el término "heterociclo" se refiere a un grupo heterociclo opcionalmente sustituido como se ha definido anteriormente que es divalente (es decir, se deriva mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo heterocíclico precursor).

Los ejemplos de grupos "heterociclo" incluyen, a modo de ejemplo y sin limitación, piridilo, dihidropiridilo, tetrahidropiridilo (piperidilo), tiazolilo, pirimidinilo, furanilo, tienilo, pirrolilo, pirazolilo, imidazolilo, tetrazolilo, benzofuranilo, tianaftalenilo, indolilo, indolenilo, quinolinilo, isoquinolinilo, bencimidazolilo, piperidinilo, 4-piperidonilo, pirrolidinilo, 2-pirrolidonilo, pirrolinilo, tetrahydrofuranilo, bis-tetrahydrofuranilo, tetrahidropirranilo, bis-tetrahidropirranilo, tetrahydroquinolinilo, tetrahydroisoquinolinilo, decahydroquinolinilo, octahydroisoquinolinilo, azocinilo, triazinilo, 6H-1,2,5-tiadiazinilo, 2H,6H-1,5,2-ditiazinilo, tienilo, tiantrenilo, piranilo, isobenzofuranilo, cromenilo, xantenilo, fenoxatinilo, 2H-pirrolilo, isotiazolilo, isoxazolilo, pirazinilo, piridazinilo, indolizínilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizínilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinolinilo, pteridinilo, 4H-carbazolilo, carbazolilo, β-carbolinilo, fenantridinilo, acridinilo, pirimidinilo, fenantrolinilo, fenazinilo, fenotiazinilo, furazanilo, fenoxazinilo, isocromanilo, cromanilo, imidazolidinilo, imidazolinilo, pirazolidinilo, pirazolinilo, piperazinilo, indolinilo, isoindolinilo, quinuclidinilo, morfolinilo, oxazolidinilo, benzotriazolilo, benzoisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo e isatinoilo. Los grupos "heterociclo" preferidos incluyen, pero sin limitación, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

Un grupo heterociclo, ya esté solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferentemente de 1 a 2 grupos, incluyendo, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ y -arilo pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, en donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈ o arilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos enlazados en el carbono pueden enlazarse en las siguientes

posiciones: posición 2, 3, 4, 5 o 6 de una piridina; posición 3, 4, 5 o 6 de una piridazina; posición 2, 4, 5 o 6 de una pirimidina; posición 2, 3, 5 o 6 de una pirazina; posición 2, 3, 4, o 5 de un furano, tetrahydrofurano, tiofurano, tiofeno, pirrol o tetrahidropirrol; posición 2, 4 o 5 de un oxazol, imidazol o tiazol; posición 3, 4 o 5 de un isoxazol, pirazol o isotiazol; posición 2 o 3 de una aziridina; posición 2, 3 o 4 de una azetidina; posición 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una quinolona; o la posición 1, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 de una isoquinolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos a carbono incluyen 2-piridilo, 3-piridilo, 4-piridilo, 5-piridilo, 6-piridilo, 3-piridazinilo, 4-piridazinilo, 5-piridazinilo, 6-piridazinilo, 2-pirimidinilo, 4-pirimidinilo, 5-pirimidinilo, 6-pirimidinilo, 2-pirazinilo, 3-pirazinilo, 5-pirazinilo, 6-pirazinilo, 2-tiazolilo, 4-tiazolilo o 5-tiazolilo.

A modo de ejemplo y no de limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno pueden unirse en la posición 1 de una aziridina, azetidina, pirrol, pirrolidina, 2-pirrolina, 3-pirrolina, imidazol, imidazolidina, 2-imidazolina, 3-imidazolina, pirazol, pirazolina, 2-pirazolina, 3-pirazolina, piperidina, piperazina, indol, indolina o 1H-indazol; posición 2 de un isoindol o una isoindolina; posición 4 de una morfolina; y posición 9 de un carbazol o una β -carbolina. Aún más típicamente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen 1-aziridilo, 1-azetidilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo y 1-piperidinilo.

A menos que se indique otra cosa, el término "carbociclo", se refiere a un sistema de anillo saturado o insaturado no aromático monocíclico, bicíclico o policíclico que tiene de 3 a 14 átomos de anillo (y todas las combinaciones y subcombinaciones de intervalos y números específicos de átomos de carbono en el mismo) en donde todos los átomos de anillo son átomos de carbono. Los carbociclos monocíclicos tienen preferentemente de 3 a 6 átomos de anillo, aún más preferentemente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbociclos bicíclicos tienen preferentemente de 7 a 12 átomos de anillo, por ejemplo, dispuestos como un sistema biciclo [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6] o 9 o 10 átomos del anillo dispuestos como un sistema biciclo [5,6] o [6,6]. El término "carbociclo" incluye, por ejemplo, un anillo carbociclo monocíclico condensado a un anillo de arilo (por ejemplo, un anillo carbociclo monocíclico condensado a un anillo de benceno). Los carbociclos tienen preferentemente de 3 a 8 átomos de anillo.

Los grupos carbociclo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden sustituirse opcionalmente con, por ejemplo, uno o más grupos, preferentemente 1 o 2 grupos (y cualquier sustituyente adicional seleccionado entre halógeno), incluyendo, pero sin limitación, -halógeno, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH₂, -C(O)NHR', -C(O)N(R')₂, -NHC(O)R', -SR', -SO₃R', -S(O)₂R', -S(O)R', -OH, =O, -N₃, -NH₂, -NH(R'), -N(R')₂ y -CN, en donde cada R' se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈ o -arilo y en donde dichos grupos -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈) y -arilo pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen, pero sin limitación, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -halógeno, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), -arilo, -C(O)R", -OC(O)R", -C(O)OR", -C(O)NH₂, -C(O)NHR", -C(O)N(R")₂, -NHC(O)R", -SR", -SO₃R", -S(O)₂R", -S(O)R", -OH, -N₃, -NH₂, -NH(R"), -N(R")₂ y -CN, donde cada R" se selecciona independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈ o -arilo.

Los ejemplos de sustituyentes carbocíclicos monocíclicos incluyen -ciclopropilo, -ciclobutilo, -ciclopentilo, -1-ciclopent-1-enilo, -1-ciclopent-2-enilo, -1-ciclopent-3-enilo, ciclohexilo, -1-ciclohex-1-enilo, -1-ciclohex-2-enilo, -1-ciclohex-3-enilo, -cicloheptilo, -ciclooctilo, -1,3-ciclohexadienilo, -1,4-ciclohexadienilo, -1,3-cicloheptadienilo, -1,3,5-cicloheptatrienilo y -ciclooctadienilo.

Un "carbociclo", ya se use solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbociclo opcionalmente sustituido como se ha definido anteriormente que es divalente (es decir, se deriva mediante la retirada de dos átomos de hidrógeno de los mismos o dos átomos de carbono diferentes de un sistema de anillo carbocíclico precursor).

A menos que el contexto indique otra cosa, un guion (-) indica el punto de unión a la molécula colgante. Por consiguiente, la expresión "-(alquilen C₁-C₈)arilo" o "-alquilen C₁-C₈(arilo)" se refiere a un radical alquilen C₁-C₈ como se define en el presente documento, en donde el radical alquilen está unido a la molécula colgante en cualquiera de los átomos de carbono del radical alquilen y uno de los átomos de hidrógeno unidos a un átomo de carbono del radical alquilen se reemplaza con un radical arilo como se define en el presente documento.

Cuando un grupo particular está "sustituido", este grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferentemente de uno a cinco sustituyentes, más preferentemente, de uno a tres sustituyentes, lo más preferentemente, de uno a dos sustituyentes, seleccionados independientemente entre la lista de sustituyentes. Sin embargo, en general, el grupo puede tener cualquier número de sustituyentes seleccionados entre halógeno. Los grupos que están sustituidos están indicados.

Se pretende que la definición de cualquier sustituyente o variable en una ubicación concreta en una molécula sea independiente de sus definiciones en otra parte en esta molécula. Debe entenderse que un experto en la materia puede seleccionar los sustituyentes y los patrones de sustitución en los compuestos de la presente invención para proporcionar compuestos que son estables químicamente y que pueden sintetizarse fácilmente mediante técnicas conocidas en la materia así como los métodos expuestos a en el presente documento.

Los grupos protectores como se usan en el presente documento se refieren a grupos que de manera selectiva bloquean, ya sea de manera temporal o permanente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de hidroxilo adecuados para su uso en la presente invención son farmacéuticamente aceptables y puede ser necesario o no escindirlos del compuesto precursor después de la administración a un sujeto para que el compuesto sea activo. La escisión es mediante procesos metabólicos normales en el organismo. Se conocen bien en la técnica grupos protectores de hidroxilo, véase, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS por T. W. Greene y P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3.^a edición) e incluyen, por ejemplo, éter (por ejemplo, alquil éteres y silil éteres que incluyen, por ejemplo, dialquilsililéter, trialquilsililéter, dialquilalcoxilsililéter), éster, carbonato, carbamatos, sulfonato y grupos protectores de fosfato. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen, pero sin limitación, metil éter; metoximetil éter, metiltiometil éter, (fenildimetilsilil)metoximetil éter, benciloximetil éter, *p*-metoxibenciloximetil éter, *p*-nitrobenciloximetil éter, *o*-nitrobenciloximetil éter, (4-metoxifenoxi)metil éter, guaiacolmetil éter, *t*-butoximetil éter, 4-penteniloximetil éter, siloximetil éter, 2-metoxietoximetil éter, 2,2,2-tricloroetoximetil éter, bis(2-cloroetoxi)metil éter, 2-(trimetilsilil)etoximetil éter, metoxi metil éter, tetrahidropiranyl éter, 1-metoxiciclohexil éter, 4-metoxitetrahidropiranyl éster, 4-metoxitetrahidropiranyl éter *S,S*-dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1-(2-fluorofenil)-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1,4-dioxan-2-il éter, tetrahidrofuranol éter, tetrahidrotiofuranil éter; etil éteres sustituidos, tales como 1-etoxietil éter, 1-(2-cloroetoxi)etil éter, 1-[2-(trimetilsilil)etoxi]etil éter, 1-metil-1-metoxietil éter, 1-metil-1-benciloxietil éter, 1-metil-1-benciloxi-2-fluoroetil éter, 1-metil-1-fenoxietil éter, 2-trimetilsilil éter, *t*-butil éter, alil éter, propargil éteres, *p*-clorofenil éster, *p*-metoxifenil éter, bencil éter, *p*-metoxibencil éter, 3,4-dimetoxibencil éter, trimetilsilil éter, trietilsilil éter, tripropilsililéter, dimetilisopropilsilil éter, dietilisopropilsilil éter, dimetilhexilsilil éter, *t*-butildimetilsilil éter, difenilmetsilil éter, éster de benzoilformiato, éster de acetato, éster de cloroacetato, éster de dicloroacetato, éster de tricloroacetato, éster de trifluoroacetato, éster de metoxiacetato, éster de trifenilmetoxiacetato, éster de fenilacetato, éster de benzoato, carbonato de alquil metilo, carbonato de alquil 9-fluorenilmetilo, carbonato de alquil etilo, carbonato de alquil 2,2,2-tricloroetilo, carbonato de 1,1-dimetil-2,2,2-tricloroetilo, alquilsulfonato, metansulfonato, bencilsulfonato, tosilato, acetal de metileno, acetal de etilideno y cetal de *t*-butilmetilideno. Los grupos protectores preferidos se representan por las fórmulas -R, -Si(R)(R)(R), -C(O)R, -C(O)OR, -C(O)NH(R), -S(O)₂R, -S(O)₂OH, P(O)(OH)₂ y -P(O)(OH)OR, en donde R es alquilo C₁-C₂₀, alqueno C₂-C₂₀, alquino C₂-C₂₀, -alquilen C₁-C₂₀(carbociclo), -alquilen C₂-C₂₀(carbociclo), -alquilen C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo C₆-C₁₀, -alquilen C₁-C₂₀(arilo), -alquilen C₂-C₂₀(arilo), -alquilen C₂-C₂₀(arilo), -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -alquilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquilen C₂-C₂₀(heterociclo) en donde dichos radicales alquilo, alqueno, alquino, alquilen, alquilen, alquilen, arilo, carbociclo y heterociclo, ya estén solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleuina-dolaprina-fenilalanina-*p*-fenilendiamina (véase la fórmula (XVIII) más adelante).

La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E (véase la fórmula (XIII) más adelante).

La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico (véase la fórmula (XXI) más adelante).

La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido haciendo reaccionar auristatina E con ácido benzoilvalérico (véase la fórmula (XXII) más adelante).

La abreviatura "MMAF" se refiere a monometil auristatina F (véase la fórmula (XXI) más adelante).

Anticuerpos

La presente divulgación se refiere a moléculas de anticuerpo anti-GCC con características tales como aquellas resumidas en las tablas 1 y 2. La presente divulgación también se refiere a moléculas de anticuerpo anti-GCC con características tales como aquellas resumidas en las tablas 3, 4, 5 y/o 6.

En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo de hibridoma humano y es el anticuerpo 5F9. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC procede del anticuerpo 5F9. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se produce por el hibridoma 5F9 (PTA-8132).

En una realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC tendrá una afinidad por GCC, por ejemplo, medida mediante ensayos de unión directa o de unión competitiva, en un intervalo descrito en el presente documento. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC tiene una K_d menor que 1×10^{-6} M, menor que 1×10^{-7} M, menor que 1×10^{-8} M, menor que 1×10^{-9} M, menor que 1×10^{-10} M, menor que 1×10^{-11} M, menor que 1×10^{-12} M o menor que 1×10^{-13} M. En una realización, la molécula de anticuerpo es una IgG o un fragmento de unión a antígeno de la misma y tiene una K_d menor que 1×10^{-6} M, menor que 1×10^{-7} M, menor que 1×10^{-8} M o menor que 1×10^{-9} M. En una realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo 5F9 o un anticuerpo derivado del mismo, tiene una K_d de aproximadamente 80 a aproximadamente 200 pM, preferentemente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 pM o aproximadamente 120 pM. En una realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo 5F9 o un anticuerpo derivado del mismo tiene una k_a de aproximadamente 0,9 a aproximadamente $1,25 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, preferentemente de aproximadamente $1,1 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. En una realización, la molécula de anticuerpo es un

scFv y tiene una K_d menor que $1 \times 10^{-6} M$, menor que $1 \times 10^{-7} M$, menor que $1 \times 10^{-8} M$, menor que $1 \times 10^{-9} M$, menor que $1 \times 10^{-10} M$, menor que $1 \times 10^{-11} M$, menor que $1 \times 10^{-12} M$ o menor que $1 \times 10^{-13} M$.

5 En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo no son inmunoconjugados, es decir, están "desnudas" y en algunas realizaciones, provocan una reacción celular tras su unión a GCC. En realizaciones relacionadas, la reacción celular se lleva a cabo por la célula que expresa GCC a la que se une el anticuerpo. Dicha reacción celular puede ser transducción de señales mediada por GCC, por ejemplo, si la molécula de anticuerpo es un antagonista de GCC (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º US20040258687). En otras realizaciones, la reacción celular se lleva a cabo por una segunda célula, por ejemplo, una célula efectora inmunitaria (por ejemplo, un linfocito citolítico natural) que reconoce la molécula de anticuerpo unida a GCC en la primera célula. En algunas realizaciones, las moléculas de vigilancia, por ejemplo, moléculas de complemento, entran en contacto con la molécula de anticuerpo unida a GCC antes de la reacción celular. Las reacciones celulares en estas realizaciones pueden provocar la muerte de la célula que expresa GCC.

15 En realizaciones adicionales, las moléculas de anticuerpo que son inmunoconjugados pueden tanto causar una reacción celular tras su unión a GCC como internalizarse para suministrar un agente a la célula que expresa GCC a la que se une.

20 En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede bloquear la unión del ligando a GCC.

En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC no logra mostrar una reacción cruzada sustancial con uno o ambos de una GCC de rata y una GCC de ratón.

25 En una realización, la molécula de anticuerpo no es GCC:B10, GCC:4D7 o GCC:C8. En otra realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC no se une a un dominio intracelular de GCC, alrededor de los restos de aminoácido 455 a 1073 de la SEQ ID NO: 228. Por ejemplo, en esta realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC no se une al dominio de homología de cinasa o al dominio de guanilil ciclasa de GCC.

30 La unidad estructural del anticuerpo de mamífero de origen natural se tipifica por un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas de polipéptido, cada par tiene una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos principalmente responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. Las cadenas ligeras humanas pueden clasificarse como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas pueden clasificarse como mu, delta, gamma, alfa o epsilon y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. En las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variable y constante están unidas por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo también la cadena pesada una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en general, *Fundamental Immunology* Cap. 7 (Paul, W., ed., 2.^a ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadena ligera/pesada forman el sitio de unión del anticuerpo. Los isotipos preferidos para las moléculas de anticuerpo anti-GCC son inmunoglobulinas IgG, que pueden clasificarse en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que tienen diferentes cadenas pesadas gamma. La mayoría de anticuerpos terapéuticos son anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados del tipo IgG1. En una realización particular, la molécula de anticuerpo anti-GCC tiene el isotipo IgG1.

45 Las regiones variables de cada par de cadena pesada y ligera forman el sitio de unión a antígeno. Por lo tanto, un anticuerpo IgG intacto tiene dos sitios de unión que son iguales. Sin embargo, los anticuerpos bifuncionales o biespecíficos son construcciones híbridas artificiales que tienen dos pares de cadena pesada/ligera diferentes, que dan como resultado dos sitios de unión diferentes.

50 Todas las cadenas muestran la misma estructura general de regiones marco (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también determinadas regiones determinantes de la complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean mediante las regiones marco, lo que permite la unión a un epítipo específico. De N-terminal a C-terminal, tanto las cadenas ligeras como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)) o Chothia y Lesk J. *Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Como se usa en el presente documento, se citan las CDR para cada una de las cadenas pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y ligera (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

60 Una molécula de anticuerpo anti-GCC de la divulgación comprende todas las CDR tanto de la cadena pesada como la ligera del anticuerpo 5F9. Las secuencias de aminoácidos de hibridoma humano, linfocitos seleccionados y porciones de anticuerpo murinas, incluyendo las regiones variables y las CDR, pueden encontrarse en la tabla 3 y la tabla 5.

65 Los inmunógenos útiles para la producción de anticuerpos anti-GCC incluyen GCC, por ejemplo, células que expresan

GCC humana (por ejemplo, una línea celular tumoral, por ejemplo, células T84 o células de tumor de colon frescas o congeladas, células recombinantes que expresan GCC); fracciones de membrana que expresan GCC (por ejemplo, una línea celular de tumor de colon, por ejemplo, células T84 o células de tumor de colon frescas o congeladas, células recombinantes que expresan GCC, por ejemplo, células HT-29-GCC n.º 2, que expresan GCC de longitud completa o una porción de la misma, por ejemplo, células CHO GCC n.º 27 que expresan una porción que comprende el dominio extracelular de GCC, por ejemplo, SEQ ID NO: 318); GCC aislada o purificada, por ejemplo, proteína GCC humana (por ejemplo, GCC aislada bioquímicamente, por ejemplo, aislada de células tumorales gastrointestinales o células recombinantes que expresan GCC o una variante de la misma) o una porción de la misma (por ejemplo, el dominio extracelular de GCC, el dominio de homología de cinasa de GCC o el dominio catalítico de guanililo ciclasa de GCC o un péptido correspondiente a una porción del mismo, por ejemplo, que comprende al menos aproximadamente 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 o 32 restos de aminoácido de la SEQ ID NO: 228); o un inmunógeno que comprende la SEQ ID NO: 229 o que comprende una porción madura de la misma sin la secuencia de señal (es decir, sin los restos de aminoácido 1 a aproximadamente 21 o 23 de la SEQ ID NO: 229), por ejemplo, la proteína TOK107-hIgG madura, SEQ ID NO: 317.

Los inmunógenos pueden fusionarse a secuencias heterólogas para ayudar en la manipulación bioquímica, la purificación, la inmunización o la medición del título de anticuerpo. Dichos inmunógenos pueden comprender una porción de GCC, por ejemplo, el dominio extracelular y una porción que comprende un polipéptido distinto de GCC. Existen diversas opciones para construir una proteína de fusión para facilitar su purificación o inmovilización sobre un soporte sólido, por ejemplo, una columna de afinidad o una placa de microtitulación u otro sustrato de ensayo/placa adecuada. Por ejemplo, un resto de fusión puede añadir un dominio, por ejemplo, glutatión-S-transferasa/cinasa (GST), que puede unirse a glutatión; una región Fc de una inmunoglobulina, que puede unirse a proteína A o proteína G; restos de aminoácido, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, preferentemente seis restos de histidina que pueden unirse a níquel o cobalto en una columna de afinidad; un marcador epitópico, por ejemplo, una porción del oncogén c-myc (marcador myc), un marcador FLAG (Patente de los Estados Unidos n.º 4.703.004), un marcador de hemaglutinina (HA), un marcador 10 de gen T7, un marcador V5, un marcador de HSV o un marcador VSV-G que puede unirse a un anticuerpo específico para el marcador; o un cofactor, por ejemplo, biotina, que puede unirse a estreptavidina.

Los inmunógenos que comprenden la porción Fc de una inmunoglobulina pueden mantener la GCC, ya se encuentre en solución o unida a una célula, en una configuración que permite el acceso estructural a epítomos de GCC por los componentes de vigilancia inmunitaria del hospedador para una eficiente generación de anticuerpos. Debido a que las cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden las regiones Fc se asocian en dímeros a través de enlaces disulfuro intercadena, los inmunógenos que resultan de la fusión con regiones Fc son dímeros. La valencia de las proteínas de fusión puede reflejar el tipo de inmunoglobulina que contribuye a una región Fc. Por ejemplo, las fusiones con proteínas IgG pueden ser dímeros, fusiones con IgA pueden producir inmunógenos tetraméricos y las fusiones con IgM pueden producir inmunógenos decaméricos, estando estos dos últimos facilitados con la cotransfección de la cadena J. Una inmunoglobulina ejemplar para una proteína de fusión de Fc es IgG1. La porción usada normalmente tiene los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG1 codificados por un solo exón. Debido a que este exón también tiene una porción de la región CH1, que tiene una cisteína orientada hacia el enlace disulfuro con una cisteína de la cadena ligera, una mutación útil es mutar la cisteína de CH1, por ejemplo, a una serina, para asegurar que no hay una cisteína no emparejada en la proteína de fusión. Dicha mutación también aumenta la flexibilidad en la bisagra.

Una porción Fc procedente de una especie no hospedadora, por ejemplo, región Fc de Ig humana, para su fusión a un inmunógeno para su inmunización en una especie hospedadora, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, actúa como un adyuvante. Esta función adyuvante puede generar anticuerpos específicos contra epítomos tanto de Fc como de GCC. Los anticuerpos reactivos con Fc pueden identificarse y desecharse durante la detección sistemática. La porción Fc puede tener una secuencia de tipo silvestre o una secuencia que está mutada para modificar la función efectora. Por ejemplo, puede incorporarse una región constante mutada (variante) en una proteína de fusión para minimizar la unión a receptores de Fc y/o la capacidad de fijarse al complemento. (Véase, por ejemplo, Winter et al., documento GB 2.209.757 B; Morrison et al., documento WO 89/07142; Morgan et al., documento WO 94/29351). En un ejemplo preferido, se mutan la lisina 235 y la glicina 237, numeradas de acuerdo con los estándares de la región Fc, por ejemplo, a alanina. Un inmunógeno/proteína de fusión con IgG mutada en Fc puede tener una interacción reducida con receptores de Fc en el hospedador. Una proteína de fusión de inmunógeno soluble preferida (después de la maduración para escindir el péptido de señal y de secreción) es TOK-107-hIgG (nombre alternativo, hGCC-ECD/hIgG1 Fc), que consiste en los restos de aminoácido 24 a 430 de la SEQ ID NO: 228 fusionados a la Fc de inmunoglobulina IgG1 humana mutada (SEQ ID NO: 317).

Para preparar un inmunógeno expresado por células, puede estructurarse la porción de inmunoglobulina para imitar una porción de inmunoglobulina del receptor de linfocitos B. Por ejemplo, la región Fc de inmunoglobulina puede fusionarse además a un polipéptido que comprende una región transmembrana de un receptor inmunitario, tal como receptores Fc γ , receptores Fc α , receptor Fc α / μ o receptores Fc ϵ . Puede mejorarse la orientación adecuada de dicho inmunógeno unido a célula de receptor Fc con una exposición adecuada en la superficie celular si la célula que expresa la proteína de fusión de inmunógeno comprende además componentes adicionales del complejo de receptor de antígeno, por ejemplo, el receptor de IgM o el receptor de IgD de linfocitos B. Los componentes adecuados del complejo incluyen proteínas de la vaina de inmunoglobulina (Ig), tales como MB-1 y B29 (CD79A y CD79B; Hombach et al. Eur. J. Immunol. 20:2795-2799 (1990) para el receptor de IgM), que forman un heterodímero. Las proteínas de

- la vaina de Ig pueden proporcionarse endógenamente por la célula transfectada, por ejemplo, si se transfecta una línea celular de linfoma de linfocitos B; o mediante cotransfección del inmunógeno con proteínas de la vaina, por ejemplo, en un vector separado o en el mismo vector. Las proteínas de la vaina de IgG preferidas para inmunización en ratones son CD79a y CD79b de ratón (n.º de referencia de GenBank NM_007655 y NM_008339, respectivamente).
- 5 Una proteína de fusión de inmunógeno unida a células preferida (después de la maduración para escindir el péptido de señal y la traslocación a la superficie celular) es el producto TOK111, que consiste en TOK-107hIgG (hGCC-ECD/hIgG1 Fc) fusionada a los dominios transmembrana e intracelulares de IgG2a de ratón (por ejemplo, el n.º de registro de GenPept AAB59661) (SEQ ID NO: 318).
- 10 Los epítomos útiles, por ejemplo, epítomos de referencia, de la molécula de GCC, a los que pueden unirse las moléculas de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados, como se describen en el presente documento, pueden encontrarse en la porción extracelular de GCC. Dichos epítomos de GCC pueden unirse a moléculas de anticuerpo en la superficie de células, por ejemplo, en el exterior celular.
- 15 Por ejemplo, un epítomo para una molécula de anticuerpo anti-GCC puede residir en o incluir uno o más restos de, los restos 1-50 de la SEQ ID NO: 228 o un fragmento del mismo que se une a una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, un fragmento de unión de 5F9 del mismo. Dichos fragmentos pueden comprender los restos 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 o 33-50 de la SEQ ID NO: 228. En algunas realizaciones, un epítomo para una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo 5F9, es un epítomo conformacional que comprende adicionalmente uno o más restos de aminoácido adicionales en la secuencia de aminoácidos de GCC más allá del resto 50, es decir, seleccionado de aproximadamente el resto 50 a 1073 de la SEQ ID NO: 228.
- 20 Los anticuerpos generados contra dichos epítomos o el dominio extracelular, por ejemplo, epítomos que residen dentro de o incluyen uno o más restos de los restos de aminoácido 24 a 420 de la SEQ ID NO: 228 o una porción de referencia de la misma, por ejemplo, los restos 24 a 75, 75 a 150, 150 a 225, 225 a 300, 300 a 375 o 375 a 420 de GCC o moléculas de anticuerpo derivadas de las mismas, pueden ser útiles como anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, como se describe en el presente documento.
- 25 En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC tiene una o más de las siguientes propiedades:
- 30 a) compite por la unión, por ejemplo, la unión a GCC en la superficie celular o GCC purificada, con una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC anteriormente citada resumidas en las tablas 1 y 2, por ejemplo, anticuerpos de hibridoma humano (por ejemplo, 5F9);
- 35 b) se une al mismo o sustancialmente al mismo, epítomo en GCC que una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC anteriormente citadas resumidas en las tablas 1 y 2, por ejemplo, anticuerpos de hibridoma humano (por ejemplo, 5F9). En una realización, el anticuerpo se une al mismo epítomo, como se determina mediante uno o más de un ensayo de matriz de péptidos o mediante unión a mutantes de truncamiento, quimeras o mutantes puntuales expresados en la superficie celular o preparaciones de membrana, por ejemplo, como se describen estos ensayos en el presente documento;
- 40 c) se une a un epítomo que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 o 20 restos de aminoácido contiguos en común con el epítomo de una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC anteriormente citadas resumidas en las tablas 1 y 2, por ejemplo, anticuerpos de hibridoma humano (por ejemplo, 5F9);
- 45 d) se une a una región de GCC humana a la que se une un anticuerpo anti-GCC de la invención, en donde la región, por ejemplo, una región extracelular o citoplasmática, tiene 10-15, 10-20, 20-30 o 20-40 restos de longitud y la unión se determina, por ejemplo, mediante unión a mutantes de truncamiento. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la región extracelular de GCC humana. En una realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC puede unirse a la porción de GCC humana del dominio extracelular definida por los restos de aminoácido 24 a 420 de la SEQ ID NO: 228. En una realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC puede unirse al sitio de firma de guanilato ciclasa en los restos de aminoácido 931 a 954 de la SEQ ID NO: 228; o
- 50 e) se une a un epítomo de referencia descrito en el presente documento.
- 55 En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la secuencia de GCC ILVDLFDNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (SEQ ID NO: 225).
- 60 En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la secuencia de GCC FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO: 226).
- En una realización, la molécula de anticuerpo se une a un epítomo conformacional. En otras realizaciones, una molécula de anticuerpo se une a un epítomo lineal.
- 65 Las moléculas de anticuerpo anti-GCC pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos

monoespecíficos, anticuerpos quiméricos (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 6.020.153) o anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos. También se contemplan por la presente invención variantes sintéticas y modificadas por ingeniería genética (véase la Patente de los Estados Unidos n.º 6.331.415) de cualquiera de los anteriores. Pueden producirse anticuerpos monoclonales mediante diversas técnicas, incluyendo metodologías convencionales de anticuerpos monoclonales murinos, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas convencional de Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Véase, en general, Harlow, E. y Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

La inmunización con proteína, por ejemplo, GCC o una porción soluble o una proteína de fusión que comprende una porción de GCC (por ejemplo, TOK107-hlg) o células o fracciones de membrana de las mismas, por ejemplo, células que expresan GCC expuesta en la superficie o una porción de la misma (por ejemplo, el producto pLKTOK4 o el producto pLKTOK111), pueden llevarse a cabo con el inmunógeno preparado para inyección de un modo para inducir una respuesta, por ejemplo, con adyuvante, por ejemplo, adyuvante completo de Freund. Otros adyuvantes adecuados incluyen, adyuvante TITERMAX GOLD® (CYTRX Corporation, Los Angeles, CA) y alumbre. Pueden usarse inmunógenos peptídicos pequeños a una molécula de mayor tamaño, tal como hemocianina de lapa californiana. Puede inyectarse a los ratones de diversas maneras, por ejemplo, subcutánea, intravenosa o intramuscular en una serie de sitios, por ejemplo, en el peritoneo (i.p.), la base de la cola o el panículo plantar o una combinación de sitios, por ejemplo, iP y base de la cola (BIP). Las inyecciones de refuerzo pueden incluir el mismo inmunógeno o uno diferente y pueden incluir adicionalmente adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund. La inmunización con ADN, por ejemplo, ADN que codifica GCC o una porción de la misma o una proteína de fusión que comprende GCC o una porción de la misma (por ejemplo, que codifica TOK107-hlg) puede inyectarse usando la tecnología de pistola génica. Por ejemplo, el ADN se carga en partículas de oro microscópicas y se inyecta a los ratones a intervalos frecuentes a lo largo de un periodo breve.

En general, cuando se desea un anticuerpo monoclonal, se produce un hibridoma fusionando una célula adecuada de una línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma, tal como SP2/0, P3X63Ag8.653 o un heteromioma) con células productoras de anticuerpo. Las células productoras de anticuerpo pueden obtenerse de la sangre periférica o, preferentemente, el bazo o los ganglios linfáticos, de seres humanos, animales transgénicos para anticuerpos humanos u otros animales adecuados inmunizados con el antígeno de interés. Las células que producen anticuerpos de origen humano (por ejemplo, un anticuerpo humano) pueden producirse usando métodos adecuados, por ejemplo, fusión de una célula productora de anticuerpos humanos y un heteromioma o trioma o inmortalización de un linfocito B humano activado mediante infección con el virus de Epstein-Barr. (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.197.582 (Trakht); Niedbala et al., *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella et al., *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson et al., *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991)). Pueden aislarse las células productoras de anticuerpo fusionadas o inmortalizadas (hibridomas) usando condiciones de cultivo selectivas y clonarse mediante dilución limitante. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden identificarse usando un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA (por ejemplo, con inmunógeno, por ejemplo, TOK107-hlgG, inmovilizado sobre el pocillo de microtitulación) o mediante FACS en una célula que expresa GCC o una porción de la misma, por ejemplo, una célula que expresa el producto pLKTOK111). Por ejemplo, si el inmunógeno de GCC comprende un resto de fusión que es un reactivo de afinidad, este resto puede permitir que la proteína de fusión que comprende GCC o una porción de la misma se una a una matriz, por ejemplo, placas de microtitulación o chips de ensayo recubiertos con proteína G, recubiertos con estreptavidina, derivatizados con glutatión o recubiertos con anticuerpo, que después se combinan con el suero inmune o el medio condicionado de un hibridoma o célula recombinante que expresa anticuerpo y la mezcla se incuba en condiciones que dan lugar a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para la sal y el pH). Después de la incubación, los pocillos de la placa de microtitulación o las celdas de la placa se lavan para retirar cualquier componente no unido y se mide la unión por el anticuerpo anti-GCC.

En algunas realizaciones, para aplicaciones terapéuticas, los anticuerpos de la presente invención son anticuerpos humanos o humanizados. La ventaja de los anticuerpos humanos o humanizados es que potencialmente reducen o eliminan la inmunogenicidad del anticuerpo en un receptor hospedador, permitiendo de este modo un aumento en la biodisponibilidad y una reducción en la posibilidad de una reacción inmunitaria adversa, permitiendo de este modo potencialmente múltiples administraciones del anticuerpo.

Los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos humanizados, quiméricos o con CDR injertadas. Las respuestas de anticuerpo humano anti-ratón (HAMA) han dado lugar al desarrollo de anticuerpos quiméricos o de otro modo humanizados. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable murina, se espera la observación de ciertas respuestas humanas anti-anticuerpo quimérico (HACA), particularmente en utilizaciones crónicas o multidosis del anticuerpo. La presencia de dichas proteínas de origen murino o de rata puede ocasionar la rápida eliminación de los anticuerpos o puede ocasionar la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por parte de un paciente. A fin de evitar la utilización de anticuerpos de origen murino o de rata, se han desarrollado anticuerpos humanizados donde se introducen secuencias, en una secuencia de anticuerpo para hacer que sea más próxima a una secuencia de anticuerpo humana, de anticuerpos completamente humanos generados mediante la introducción de función de anticuerpo humano en un roedor, de tal forma que el roedor puede producir anticuerpos que tienen secuencias totalmente humanas. Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas, de conejo o de rata.

Anticuerpos humanos

5 Las moléculas de anticuerpo completamente humanas pueden minimizar las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los mAb de ratón o derivados de ratón y por tanto, aumentar la eficacia y seguridad de los anticuerpos humanizados. El uso de moléculas de anticuerpo completamente humanas puede proporcionar una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades humanas crónicas y recurrentes, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren administraciones repetidas de anticuerpo. Asimismo, pueden producirse moléculas de anticuerpo humanas usando estirpes de animales modificadas por ingeniería genética en las que se suprime la expresión génica de anticuerpo del animal y se reemplazan funcionalmente con la expresión génica de moléculas de anticuerpo humanas.

15 Se conocen en la técnica métodos para producir anticuerpos humanos. Un método para producir anticuerpos humanos emplea el uso de animales transgénicos, tal como un ratón transgénico. Estos animales transgénicos contienen una porción sustancial del genoma productor del anticuerpo humano, por ejemplo, un locus de inmunoglobulina humano que puede someterse a reordenamiento funcional, insertado en su propio genoma y la producción de anticuerpos endógenos del propio animal se hace deficiente para la producción de anticuerpos. Se conocen en la técnica métodos para producir dichos animales transgénicos. Dichos animales transgénicos pueden producirse usando la tecnología XENOMOUSE™ o usando una estrategia de "minilocus". Se describen métodos para producir XENOMICE™ en las Patentes de los Estados Unidos n.º 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598 y 6.075.181. Se describen métodos para producir animales transgénicos usando la estrategia de "minilocus" estados Unidos n.º 5.545.807, 5.545.806 y 5.625.825; véase también la Publicación Internacional n.º WO93/12227. Otros ratones transgénicos productores de anticuerpos humanos incluyen HUMAB-MOUSE®, ratones transcromosómicos KIRIN TC MOUSE™, KM-MOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ).

25 Usando la tecnología de animales transgénicos para anticuerpos humanos, por ejemplo, la tecnología XENOMOUSE™, pueden obtenerse anticuerpos humanos inmunizando a un ratón XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, Calif.) con un antígeno de interés. Se recuperan las células linfáticas (tales como linfocitos B) (por ejemplo, se aíslan de tejido del bazo) de los ratones que expresan anticuerpos. Estas células recuperadas pueden fusionarse con una línea celular de tipo mielóide para preparar líneas celulares de hibridoma inmortal, usando metodología convencional. Estas líneas celulares de hibridoma pueden explorarse y seleccionarse para identificar líneas celulares de hibridoma que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés.

35 Los animales transgénicos para anticuerpos humanos proporcionan una fuente de ácidos nucleicos que pueden enriquecerse respecto de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos que tienen las propiedades deseadas, tales como especificidad y afinidad. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o regiones variables de anticuerpo pueden aislarse de ratones transgénicos para anticuerpos humanos que se han inmunizado con una proteína GCC o una variante o porción de la misma. Los ácidos nucleicos aislados o las porciones de los mismos (por ejemplo, porciones que codifican regiones variables, CDR, regiones marco) pueden expresarse usando cualquier método adecuado (por ejemplo, presentación en fagos) para producir una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de unión a antígeno monocatenarios, fragmentos de unión a antígeno bicatenarios) que está enriquecida respecto de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen a una proteína GCC. Dicha biblioteca puede mostrar una diversidad mejorada (por ejemplo, diversidad combinatoria mediante el emparejamiento de regiones variables de cadena pesada y regiones variables de cadena ligera) en relación con el repertorio de anticuerpos producidos en el animal transgénico para anticuerpos humanos inmunizado. La biblioteca puede explorarse usando cualquier ensayo adecuado (por ejemplo, un ensayo de unión a proteína GCC) para identificar anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen las propiedades deseadas (por ejemplo, especificidad, afinidad). Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que tienen propiedades deseadas pueden recuperarse usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.871.907 (Winter et al.) y la Patente de los Estados Unidos n.º 6.057.098 (Buechler et al.)).

45 Como alternativa, los anticuerpos pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Más específicamente, pueden clonarse secuencias que codifican anticuerpos particulares a partir de células que producen los anticuerpos y usarse para la transformación de una célula hospedadora de mamífero adecuada. En un método preferido, se aíslan de los ratones el bazo y/o linfocitos de ganglio linfático de ratones inmunizados y se siembran en ensayos de placas como se ha descrito anteriormente en Babcook et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 93: 7843-8 (1996). En resumen, las células se emplan en agar con glóbulos rojos de oveja, se recubren con antígeno GCC y las células que secretan el mAb contra el antígeno de GCC se fijarán al complemento y lisarán los glóbulos rojos que rodean inmediatamente a las células productoras de mAb. Las células en las placas aclaradas se elevan para la secuenciación de las secuencias de inmunoglobulina y su subclonación en vectores de expresión. Los sobrenadantes de células transfectadas transitoriamente que contienen mAb específico para GCC se exploran posteriormente mediante ELISA y respecto de su unión a células mediante citometría de flujo. Las secuencias variables o una porción de las mismas de los anticuerpos humanos producidos que comprenden CDR que se unen a epítopos particulares pueden utilizarse para la producción de anticuerpos modificados. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos producidos pueden cortarse y empalmarse en un casete de expresión para facilitar la transferencia de las construcciones, aumentar la expresión de las construcciones y/o incorporar las construcciones en vectores capaces

de expresar anticuerpos de longitud completa, véase, por ejemplo, el documento US20060147445. En una realización particular, el casete de expresión comprende la región constante de cadena pesada del isotipo IgG1.

También puede usarse el método de anticuerpo de linfocito seleccionado (SLAM, véase la Patente de los Estados Unidos n.º 5.627.052, Babcook et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93:7843-7848 (1996)) para identificar células que pueden proporcionar el anticuerpo de interés. En SLAM, los linfocitos B se cultivan directamente, evitando de este modo la tecnología de hibridoma, que normalmente captura únicamente un pequeño porcentaje de los anticuerpos generados originalmente por un ratón. Usando ensayos basados en microplacas, los linfocitos B se ensayan rápidamente a lo largo de un periodo de varios días. Normalmente, se identifican miles de clones celulares que reaccionan con antígeno, que representan miles de anticuerpos monoclonales individuales específicos de antígeno, por ejemplo, específicos para GCC. El número de diferentes anticuerpos monoclonales que reaccionan con el antígeno identificado en un solo experimento normalmente aumenta considerablemente. Después de aplicar ensayos rápidos basados en microplacas para medir y clasificar los anticuerpos según su afinidad y función, pueden seleccionarse clones de linfocitos B que producen anticuerpos de una calidad extremadamente alta. Además, al evitar la etapa de generación de hibridoma, la producción puede moverse rápidamente a una línea celular productora recombinante. Los linfocitos B individuales seleccionados usando la tecnología se aíslan y los genes de anticuerpo pueden introducirse directamente en una línea celular productora. Después, puede desarrollarse la línea celular productora para pruebas en ensayos clínicos esencialmente en el mismo espacio de tiempo que el necesario para el desarrollo de la línea celular de hibridoma.

El mAb 5F9 (IgG2, kappa) puede producirse por el hibridoma 5F9, también citado como el hibridoma 46.5F9.8.2, que se depositó el 10 de enero de 2007, en nombre de Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139, EE. UU., en la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, EE. UU., con el n.º de referencia PTA-8132. (El depósito se efectuó conforme a lo dispuesto y cumpliendo con, los requisitos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes). La invención se refiere al hibridoma 5F9, al anticuerpo que produce, a fragmentos de unión a antígeno del mismo y a ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo y porciones del mismo (por ejemplo, la cadena pesada, la región variable de cadena pesada, la cadena ligera, la región variable de cadena ligera, las CDR). Como se describe en el presente documento, el hibridoma 5F9 produce un anticuerpo IgG2, kappa.

Tecnologías de humanización y presentación y modificaciones de anticuerpos

Como se analizó anteriormente, hay ventajas en la producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida. Esto puede lograrse en conexión con técnicas de inmunización y técnicas de presentación que usan bibliotecas adecuadas. Se apreciará que los anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies pueden humanizarse o primatizarse usando técnicas conocidas en la técnica. Véanse, por ejemplo, Winter y Harris Immunol Today 14:43-46 (1993) y Wright et al. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés puede modificarse por ingeniería genética mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, bisagra y/o el dominio marco con la secuencia humana correspondiente (véase el documento WO 92/02190 y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Asimismo, se conoce en la técnica el uso de ADNc de Ig para la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos (Liu et al., Proc Natl Acad Sci USA. 84:3439 (1987) y J. Immunol. 139:3521 (1987)). El ARNm se aísla a partir de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés puede amplificarse mediante la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (Patentes de los Estados Unidos n.º 4.683.195 y 4.683.202).

Como alternativa, la tecnología de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al, Nature, 348:552-553 (1990)) puede usarse para producir anticuerpos y fragmentos de anticuerpos humanos *in vitro*, a partir de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina, por ejemplo, a partir de repertorios de donantes inmunizados. De acuerdo con esta técnica, se clonan genes de dominio V de anticuerpo en el marco de un gen de proteína mayor o menor de la envoltura de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd y se presentan como fragmentos de anticuerpo funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenario del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que muestra esas propiedades. Por lo tanto, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos puede realizarse en diversos formatos; para su revisión véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell, Current Opinion in Structural Biology, 3:564-571 (1993). Pueden usarse varias fuentes de segmentos de genes V para la presentación en fagos. Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991) aislaron una serie de diversos anticuerpos dirigidos contra oxazolona a partir de una biblioteca combinatoria aleatoria pequeña de genes V derivados de los bazo de ratones inmunizados. Puede construirse un repertorio de genes V de donantes humanos no inmunizados y pueden aislarse anticuerpos para una serie diversa de antígenos (incluyendo auto antígenos) esencialmente siguiendo las técnicas descritas en Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) o Griffith et al, EMBO J., 12:725-734 (1993). Véase, también, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.565.332 y 5.573.905. Las bibliotecas de presentación pueden contener anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que contienen secuencias de aminoácidos artificiales. Por ejemplo, la biblioteca puede contener fragmentos Fab que contienen CDR artificiales (por ejemplo, secuencias de aminoácidos aleatorias) y regiones marco humanas. (Véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 6.300.064 (Knappik, et al.)).

También pueden generarse anticuerpos humanos por linfocitos B activados *in vitro* (véanse las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.567.610 y 5.229.275).

5 Las secuencias de genes de región constante humana pueden encontrarse en Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Publicación de los N.I.H. n.º 91-3242. Los genes de región C humana se encuentran fácilmente disponibles de clones conocidos. La elección del isotipo estará guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como la fijación al complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En realizaciones particulares, las moléculas de anticuerpo de la
10 invención son IgG1 e IgG2. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. Después se expresa el anticuerpo quimérico humanizado mediante métodos convencionales.

En algunas realizaciones, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede provocar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) en una célula que expresa GCC, por ejemplo, una célula tumoral. Los anticuerpos con los isotipos IgG1 e IgG3 son útiles para provocar función efectora en una capacidad citotóxica dependiente de anticuerpo, debido a su capacidad para unirse al receptor de Fc. Los anticuerpos con los isotipos IgG2 e IgG4 son útiles para minimizar la respuesta de ADCC debido a su baja capacidad para unirse al receptor de Fc. En realizaciones relacionadas, pueden efectuarse sustituciones en la región Fc o cambios en la composición de glucosilación de un anticuerpo, por ejemplo, mediante cultivo en una línea celular eucariota modificada, para potenciar la capacidad de los receptores de Fc para reconocer, unirse a y/o mediar los efectos de citotoxicidad a los que se unen los anticuerpos anti-GCC (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.317.091, 5.624.821 y publicaciones que incluyen el documento WO 00/42072, Shields, et al. J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001), Lazar et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103:4005-4010 (2006), Satoh et al. Expert Opin Biol. Ther. 6:1161-1173 (2006)). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de origen humano, anticuerpo humano)
15 puede incluir sustituciones o reemplazos de aminoácidos que alteran o ajustan la función (por ejemplo, función efectora). Por ejemplo, puede diseñarse una región constante de origen humano (por ejemplo, región constante γ 1, región constante γ 2) para reducir la activación del complemento y/o la unión al receptor de Fc (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.648.260 (Winter et al.), 5.624.821 (Winter et al.) y 5.834.597 (Tso et al.)). Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene dichas sustituciones o reemplazos de aminoácidos es al menos aproximadamente un 95 % idéntica a lo largo de la longitud completa respecto de la secuencia de aminoácidos de la región constante no alterada de origen humano, más preferentemente, al menos aproximadamente un 99 % idéntica a lo largo de la longitud completa respecto de la secuencia de aminoácidos de la región constante no alterada de origen humano.

35 En otra realización más, también pueden alterarse las funciones efectoras modulando el patrón de glucosilación del anticuerpo. Por alteración se entiende la eliminación de uno o más restos de carbohidrato encontrados en el anticuerpo y/o la adición de uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el anticuerpo. Por ejemplo, se describen anticuerpos con actividades ADCC potenciadas con una estructura de carbohidratos madura que carece de fucosa unida a una región Fc del anticuerpo en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2003/0157108 (Presta). Véase también la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi también ha desarrollado líneas celulares de levadura capaces de producir glucoformas específicas de anticuerpos.

Además o como alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tiene un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de ADCC de los anticuerpos. Dichas modificaciones de hidratos de carbono se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Se han descrito en la materia células con la maquinaria de glucosilación alterada y pueden usarse como células hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1.176.195 por Hang et al. describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosiltransferasa, de manera que los anticuerpos expresados en dicha línea celular presentan hipofucosilación. La Publicación PCT WO 03/035835 concedida a Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lec13, con capacidad reducida para unir fucosa a los hidratos de carbono unidos a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (véase también Shields, R. L. et al., 2002 J. Biol. Chem. 277:26733-26740). La Publicación PCT WO 99/54342 concedida a Umana et al. describe líneas celulares diseñadas por ingeniería genética para expresar glucosiltransferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)), de manera que dichos anticuerpos expresados en las líneas celulares diseñadas por ingeniería genética presentan estructuras GlcNAc bisectadas aumentadas que dan como resultado una actividad de ADCC aumentada de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180).

También pueden producirse anticuerpos humanizados usando una estrategia de injerto de CDR. Se conocen en la especialidad técnicas de generación de dichos anticuerpos humanizados. En general, los anticuerpos humanizados se producen obteniendo secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias variables pesadas y variables ligeras de un anticuerpo que se une a GCC, identificando la región determinante de la complementariedad o "CDR"
65

5 en las secuencias variable pesada y variable ligera e injertando las secuencias de ácido nucleico de las CDR en
 secuencias de ácido nucleico de marco humano. (Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º
 4.816.567 y 5.225.539). Puede determinarse la localización de las CDR y los restos del marco (véase, Kabat, E.A., et
 al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health and Human
 Services, Publicación del NIH n.º 91-3242 y Chothia, C. et al. J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Las moléculas de
 anticuerpo anti-GCC descritas en el presente documento tienen las secuencias de aminoácidos de CDR y las
 10 secuencias de ácido nucleico que codifican las CDR listadas en las tablas 5 y 6. En algunas realizaciones, pueden
 incorporarse secuencias de las tablas 5 y 6 en moléculas que reconocen a GCC para su uso en los métodos
 terapéuticos o de diagnóstico descritos en el presente documento. El marco humano que se selecciona es uno que es
 adecuado para administración *in vivo*, lo que significa que no muestra inmunogenicidad. Por ejemplo, dicha
 15 determinación puede efectuarse mediante la experiencia previa con el uso *in vivo* de dichos anticuerpos y estudios de
 similitudes de aminoácidos. Puede seleccionarse una región marco adecuada de un anticuerpo de origen humano que
 tiene aproximadamente un 65 % de identidad de secuencia de aminoácidos y preferentemente, al menos
 aproximadamente un 70 %, 80 %, 90 % o 95 % de identidad de secuencia de aminoácidos a lo largo de la longitud de
 la región marco en la secuencia de aminoácidos de la porción equivalente (por ejemplo, región marco) del anticuerpo
 donante, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC. Puede determinarse la identidad de secuencia de
 aminoácidos usando un algoritmo de alineamiento de secuencias de aminoácidos adecuado, tal como CLUSTAL W,
 usando los parámetros por defecto. (Thompson J.D. et al., Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 (1994)).

20 Una vez que se han identificado las CDR y las FR del anticuerpo clonado que se van a humanizar, se identifican las
 secuencias de aminoácidos que codifican las CDR y se injertan las secuencias de ácido nucleico correspondientes en
 las FR humanas seleccionadas. Esto puede efectuarse usando cebadores y enlazadores conocidos, cuya selección
 se conoce en la técnica. Pueden reemplazarse todas las CDR de un anticuerpo humano particular con al menos una
 25 porción de una CDR no humana o pueden reemplazarse solo algunas de las CDR con CDR no humanas. Solo es
 necesario reemplazar el número de CDR necesarias para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno
 predeterminado. Después de injertar las CDR en las FR humanas seleccionadas, se expresan las secuencias variable
 pesada y variable ligera "humanizadas" para producir un Fv humanizado o un anticuerpo humanizado que se une a
 GCC. Preferentemente, el anticuerpo con injerto de CDR (por ejemplo, humanizado) se une a la proteína GCC con
 una afinidad similar a, sustancialmente igual que o mejor que la del anticuerpo donante. Normalmente, las secuencias
 30 variables pesadas y ligeras se expresan como una proteína de fusión con secuencias de dominio constante humano
 de tal forma que se obtiene un anticuerpo intacto que se une a GCC. Sin embargo, puede producirse un anticuerpo
 Fv humanizado que no contiene las secuencias constantes.

35 También se divulgan anticuerpos humanizados en los que se han sustituido, eliminado o añadido aminoácidos
 específicos. En particular, los anticuerpos humanizados pueden tener sustituciones de aminoácidos en la región
 marco, a fin de mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, puede reemplazarse un pequeño número seleccionado de
 restos marco aceptores de la cadena de inmunoglobulina humanizada por los aminoácidos donantes
 correspondientes. Las ubicaciones de las sustituciones incluyen los restos de aminoácido adyacentes a la CDR o que
 40 son capaces de interactuar con una CDR (véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.585.089 o
 5.859.205). El marco aceptor puede ser una secuencia marco de anticuerpo humano madura o una secuencia
 consenso. Como se usa en el presente documento, la expresión "secuencia consenso" se refiere a la secuencia
 hallada más frecuentemente o diseñada a partir de los restos más comunes en cada posición en una secuencia en
 una región entre miembros de la familia relacionados. Se encuentra disponible una serie de secuencias consenso de
 anticuerpo humanas, incluyendo secuencias consenso para los diferentes subgrupos de regiones variables humanas
 45 (véase, Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Quinta edición, U.S. Department of Health
 and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). La base de datos de Kabat y sus aplicaciones se
 encuentran libremente disponibles en línea, por ejemplo mediante IgBLAST en el National Center for Biotechnology
 Information, Bethesda, MD (véase también, Johnson, G. y Wu, T.T., Nucleic Acids Research 29:205-206 (2001)).

50 Se describen otras técnicas para humanizar anticuerpos en Padlan et al., documento EP 519596 A1, publicado el 23
 de diciembre de 1992.

La molécula de anticuerpo anti-GCC incluye otros anticuerpos humanizados que también pueden modificarse
 mediante la eliminación específica de epítomos de linfocitos T o "desinmunización" mediante los métodos divulgados
 55 en las Publicaciones PCT n.º WO 98/52976 y WO 00/34317. En resumen, pueden analizarse las regiones variables
 de cadena pesada y ligera murinas de un anticuerpo anti-GCC respecto de péptidos que se unen a la clase II del MHC;
 estos péptidos representan potenciales epítomos de linfocitos T. Para la detección de potenciales epítomos de linfocitos
 T, puede aplicarse una estrategia de modelado por ordenador denominada "reconocimiento de plegamiento de
 péptidos" y además, pueden hacerse búsquedas en una base de datos de péptidos de unión a la clase II del MHC
 60 humano respecto de motivos presentes en las secuencias de VH y VL murinas, como se describe en las Publicaciones
 PCT n.º WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se unen a cualquiera de los 18 principales alotipos DR de la
 clase II del MHC y por lo tanto, constituyen potenciales epítomos de linfocitos T. Los potenciales epítomos de linfocitos
 T pueden eliminarse sustituyendo un pequeño número de restos de aminoácido en las regiones variables o
 preferentemente, mediante sustituciones de aminoácidos individuales. En la medida de lo posible, se efectúan
 65 sustituciones conservativas, normalmente pero no de manera exclusiva, puede usarse un aminoácido común en esta
 posición en secuencias de anticuerpo de línea germinal humana. Las secuencias de línea germinal humana se

divulgan en Tomlinson, I.A. et al., J. Mol. Biol. 227:776-798(1992); Cook, G. P. et al., Immunol. Today Vol. 16 (5): 237-242(1995); Chothia, D. et al., J. Mol. Bio. 227:799-817(1992). El directorio V BASE proporciona un directorio exhaustivo de secuencias de región variable de inmunoglobulina humana (compilado por Tomlinson, I. A. et al. MRC Centre for Protein Engineering, Cambridge, R. U.). Después de construirse las VH y VL desinmunizadas de un anticuerpo anti-GCC mediante mutagénesis de los genes VH y VL murinos, la secuencia variable mutagenizada puede, opcionalmente, fusionarse a una región constante humana, por ejemplo, regiones constantes de IgG1 o k humanas.

En otras realizaciones, la reducción de una respuesta inmunogénica por un anticuerpo con CDR injertadas puede lograrse mediante cambios, por ejemplo, eliminaciones, sustituciones, de restos de aminoácidos en las CDR (Kashmiri et al. Methods 36:25-34 (2005), Patente de los Estados Unidos n.º 6.818.749, Tan et al. J. Immunol. 169:1119-1125 (2006)). Por ejemplo, preferentemente, no se cambiarán los restos en las posiciones implicadas en el contacto con el antígeno. Normalmente, dichos restos, los SDR, se encuentran en posiciones que presentan altos niveles de variabilidad entre anticuerpos. Las secuencias consenso (por ejemplo, las SEQ ID NO: 302-307, tabla 5) derivadas, por ejemplo, mediante el método Clustal (Higgins D. G. et al., Meth. Enzymol. 266:383-402 (1996)), de moléculas de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, de anticuerpos descritos en el presente documento, ayudan a identificar las SDR. En las moléculas de anticuerpo humanas anti-GCC descritas en el presente documento, las SDR son los siguientes, al menos el primer resto o en algunas realizaciones, los primeros cuatro restos de la CDR1 de cadena pesada; al menos la porción N-terminal, por ejemplo, los primeros siete, diez o 13 restos de la CDR2 de cadena pesada; prácticamente la totalidad de la CDR3 de cadena pesada; la porción C-terminal, por ejemplo, después del resto seis, ocho o nueve de la CDR1 de cadena ligera; aproximadamente el primer resto, el intermedio y/o el último de la CDR2 de cadena ligera; y la mayor parte de la CDR3 de la cadena ligera o al menos después del resto dos o tres. Por consiguiente, para mantener la unión a la proteína GCC después de la humanización o modificación de una molécula de anticuerpo anti-GCC, dichos restos SDR en las CDR de las moléculas de anticuerpo anti-GCC son menos susceptibles a cambios, por ejemplo, de restos murinos a restos consenso humanos que son restos en otros restos de las CDR o las regiones marco. Por el contrario, puede ser beneficioso cambiar restos en CDR no humanas, por ejemplo, murinas a restos identificados como consenso en las CDR humanas, por ejemplo, CDR de moléculas de anticuerpo anti-GCC descritas en el presente documento (por ejemplo, las secuencias listadas en la tabla 5). Por ejemplo, una serina puede representar un resto humano para el extremo C-terminal de la CDR1 de cadena pesada y/o una tirosina puede representar un resto humano para los restos segundo y/o tercero de la CDR1 de cadena pesada; la CDR2 de cadena pesada puede terminar en S-(L/V)-K-(S/G) (SEQ ID NO: 312) para representar una CDR humana; para representar una CDR3 humana, puede haber una glicina después de cuatro a seis restos y/o un aspartato de seis a nueve restos en la CDR3 de cadena pesada; la CDR1 de cadena ligera puede comenzar con (K/R)-(A/S)-SQS-(V/I)-(S/I) (SEQ ID NO: 313) para representar una CDR humana; la CDR2 de cadena ligera puede tener una serina en el tercer resto y/o una arginina en el quinto resto representa una CDR humana; y/o la CDR3 de cadena ligera puede tener una glutamina en el segundo resto y/o una tirosina o serina en el tercer resto representa una CDR humana.

Los anticuerpos anti-GCC que no son anticuerpos intactos también son útiles en la presente invención. Dichos anticuerpos pueden derivarse de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Las moléculas de anticuerpo útiles de este tipo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., Nature 341:544-546 (1989)), que consiste en un dominio VH; (vii) un anticuerpo de cadena pesada funcional de un solo dominio, que consiste en un dominio VHH (conocido como un nanocuerpo), véase, por ejemplo, Cortez-Retamozo, et al., Cancer Res. 64: 2853-2857(2004) y las referencias citadas en el mismo; y (vii) una CDR aislada, por ejemplo, una o más CDR aisladas junto con suficiente marco para proporcionar un fragmento de unión a antígeno. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. Science 242:423-426 (1988); y Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988). También se pretende que dichos anticuerpos monocatenarios estén abarcados dentro de la expresión "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia y se seleccionan en función de su utilidad del mismo modo que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, F(ab')₂ y Fab pueden prepararse mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante escisión por proteasas o química.

La presente divulgación describe que, algunas o todas las secuencias CDR, de una o tanto de la cadena pesada como la ligera, pueden usarse en otra molécula de anticuerpo, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo con injerto de CDR, humanizada o quimérica.

La presente divulgación incluye una molécula de anticuerpo que comprende suficientes CDR, por ejemplo, las seis CDR del anticuerpo de la invención para permitir la unión a GCC de la superficie celular.

La presente divulgación describe que las CDR, por ejemplo, todas las HCDR o todas las LCDR o las seis, se incluyen en regiones marco humanas o derivadas de ser humano. Los ejemplos de regiones marco humanas incluyen secuencias marco de línea germinal humana, secuencias de línea germinal humana que se han madurado por afinidad

(ya sea *in vivo* o *in vitro*) o secuencias humanas sintéticas, por ejemplo, secuencias consenso. En una realización, el marco de cadena pesada es un marco de IgG1 o IgG2. En una realización, el marco de cadena ligera es un marco kappa.

5 La presente divulgación describe que la molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, una molécula de anticuerpo con injerto de CDR o humanizada, comprende suficientes CDR, por ejemplo, las seis CDR de uno de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, las secuencias listadas en la tabla 5, para permitir la unión a GCC. (Las secuencias de ácido nucleico ejemplares que pueden codificar las secuencias de aminoácidos listadas en la tabla 5 se proporcionan en la tabla 6 en el presente documento). La molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención
10 comprende las CDR de 5F9.

Los fragmentos de anticuerpo para su uso terapéutico o diagnóstico *in vivo* pueden beneficiarse de modificaciones que mejoran sus semividas en suero. Los restos orgánicos adecuados pensados para aumentar la semivida *in vivo* del anticuerpo pueden incluir uno, dos o más restos lineales o ramificados seleccionados entre un grupo polimérico hidrófilo (por ejemplo, un polímero lineal o ramificado (por ejemplo, un polialcano glicol, tal como polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol y similares), un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, una celulosa, un polisacárido y similares), un polímero de un aminoácido hidrófilo (por ejemplo, polilisina, poliaspartato y similares), un óxido de polialcano y polivinilpirrolidona), un grupo de ácido graso (por ejemplo, un ácido monocarboxílico o un ácido dicarboxílico), un grupo éster de ácido graso, un grupo lipídico (por ejemplo, grupo diacilglicerol, grupo esfingolípido (por ejemplo, ceramidilo)) o un grupo fosfolípido (por ejemplo, grupo fosfatidiletanolamina). Preferentemente, el resto orgánico está unido a un sitio predeterminado donde el resto orgánico no deteriora la función (por ejemplo, reduce la afinidad de unión a antígeno) del inmunocombinado resultante en comparación con el resto de anticuerpo no conjugado. El resto orgánico puede tener un peso molecular de aproximadamente 500 Da a aproximadamente 50.000 Da, preferentemente de aproximadamente 2000, 5000, 10.000 o 20.000 Da. Los ejemplos y métodos para modificar polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, con restos orgánicos pueden encontrarse, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.179.337 y 5.612.460, las Publicaciones PCT n.º WO 95/06058 y WO 00/26256 y la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 20030026805.

Una molécula de anticuerpo anti-GCC puede comprender la totalidad o un fragmento de unión a antígeno de la región variable, o una o ambas de, la cadena pesada y la cadena ligera, del anticuerpo 5F9.

En una realización, la secuencia de aminoácidos de cadena ligera de (a) puede diferir respecto de una de las secuencias de aminoácidos de referencia citadas en (a)(i-ii) en tantos como 1, 2, 3, 4, 5, 10 o 15 restos. En algunas realizaciones, las diferencias son sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, las diferencias son en las regiones marco. En una realización, la secuencia de aminoácidos de cadena pesada de (b) puede diferir respecto de una de las secuencias de aminoácidos de referencia citadas en (b)(i-ii) en tantos como 1, 2, 3, 4, 5, 10 o 15 restos. En algunas realizaciones, las diferencias son sustituciones conservativas. En algunas realizaciones, las diferencias son en las regiones marco.

40 La presente divulgación describe que la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende una o ambas de:

(a) una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la totalidad o un fragmento de unión a antígeno de, o bien, (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera de la tabla 3, por ejemplo, la SEQ ID NO: 20 o (ii) un aminoácido de región variable de cadena ligera codificada por una secuencia de nucleótido de la tabla 4, por ejemplo, la SEQ ID NO: 19; y

(b) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la totalidad o un fragmento de unión a antígeno de, o bien (i) una secuencia de aminoácidos de región variable de cadena pesada de la tabla 3, por ejemplo, la SEQ ID NO: 18 o (ii) una secuencia de aminoácidos de cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos de la tabla 4, por ejemplo, SEQ ID NO: 17.

La presente divulgación describe que la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende una o ambas de:

a) una región variable de cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que tiene al menos un 85, 90, 95, 97 o un 99 % de homología con la región variable de cadena ligera de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención; y

(b) una región variable de cadena pesada o un fragmento de unión a antígeno de la misma, que tiene al menos un 85, 90, 95, 97 o un 99 % de homología con la región variable de cadena pesada de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención.

Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de hibridoma humano, linfocitos seleccionados y anticuerpos murinos pueden encontrarse en la tabla 3.

65 La presente divulgación describe que, la molécula de anticuerpo anti-GCC es una molécula de anticuerpo 5F9 e incluye una o ambas de: a) la totalidad o un fragmento de la región constante de cadena pesada de la SEQ ID NO: 231; y b)

la totalidad o un fragmento de la región constante de cadena ligera de la SEQ ID NO: 233.

En un enfoque, pueden usarse secuencias consenso que codifican las regiones J de cadena pesada y ligera para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la posterior unión de segmentos V a segmentos de región C humana. El ADNc de región C puede modificarse mediante mutagénesis de sitio dirigido para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia CH o CL de inmunoglobulina humana funcionalmente completa, con sitios de restricción adecuados modificados por ingeniería genética, de tal forma que puede insertarse y expresarse fácilmente cualquier secuencia de VH o VL. En dichos vectores, el corte y empalme normalmente se produce entre el sitio donador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana y también en las regiones de corte y empalme que se producen en los exones CH humanos. Los vectores de expresión adecuados pueden contener una serie de componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador de selección, uno o más elementos de control de la expresión, tales como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia de señal o secuencia líder y similares. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos cadena debajo de las regiones codificantes. El anticuerpo quimérico resultante puede unirse a cualquier promotor fuerte. Los ejemplos de vectores adecuados que pueden usarse incluyen aquellos que son adecuados para hospedadores mamíferos y basados en sistemas de replicación vírica, tales como el virus de simio 40 (SV40), virus del sarcoma de Rous (RSV), adenovirus 2, virus del papiloma bovino (BPV), papovavirus BK mutante (BKV) o citomegalovirus de ratón y humano (CMV) y virus de la leucemia murina de Moloney (MMLV), promotores de Ig nativos, etc. Se conocen en la técnica diversos vectores adecuados, incluyendo vectores que se mantienen en una sola copia o múltiples copias o que se integran en el cromosoma de la célula hospedadora, por ejemplo, mediante LTR o mediante cromosomas artificiales modificados por ingeniería genética con múltiples sitios de integración (Lindenbaum et al. *Nucleic Acids Res.* 32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng.* en línea, 20 de mayo de 2009). Se listan ejemplos adicionales de vectores adecuados en una sección posterior.

Por lo tanto, la invención proporciona un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores), cadena de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera) o porción de unión a antígeno de una cadena de anticuerpo que se une a una proteína GCC.

La expresión en células hospedadoras eucariotas es útil debido a que dichas células tienen más probabilidades que las células procariontas de ensamblar y secretar un anticuerpo adecuadamente plegado e inmunológicamente activo. Sin embargo, un anticuerpo producido que es inactivo debido a un plegamiento no adecuado puede ser renaturalizable de acuerdo con métodos conocidos (Kim y Baldwin, "Specific Intermediates in the Folding Reactions of Small Proteins and the Mechanism of Protein Folding", *Ann. Rev. Biochem.* 51, págs. 459-89 (1982)). Es posible que las células hospedadoras produzcan porciones de anticuerpos intactos, tales como dímeros de cadena ligera o dímeros de cadena pesada, que también son homólogos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

Además, como se describe en otra parte en el presente documento, pueden generarse anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies mediante tecnologías de tipo presentación, incluyendo, sin limitación, presentación en fagos, presentación retroviral, presentación en ribosomas y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la especialidad y las moléculas resultantes pueden someterse a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, como se conocen dichas técnicas en la especialidad. Winter y Harris *Immunol Today* 14:43-46 (1993) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992), Hanes y Plutchau *PNAS USA* 94:4937-4942 (1997) (presentación en ribosomas), Parmley y Smith *Gene* 73:305-318 (1988) (presentación en fagos), Scott *TIBS* 17:241-245 (1992), Cwirla et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6378-6382 (1990), Russel et al. *Nucl. Acids Research* 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. *Immunol. Reviews* 130:43-68 (1992), Chiswell y McCafferty *TIBTECH* 10:80-84 (1992) y la Patente de los Estados Unidos n.º 5.733.743. En caso de usarse tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos pueden humanizarse como se ha descrito anteriormente.

Se apreciará que los anticuerpos que se generan no necesitan poseer inicialmente un isotipo particular deseado pero, en cambio, el anticuerpo generado puede poseer cualquier isotipo. Por ejemplo, el anticuerpo producido por el híbrido 5F9 (n.º de depósito de la ATCC PTA-8132) tiene el isotipo IgG2. Posteriormente puede cambiarse el isotipo del anticuerpo, por ejemplo, a IgG1 o IgG3 para provocar una respuesta de ADCC cuando el anticuerpo se une a GCC en una célula, usando técnicas convencionales que se conocen en la técnica. Dichas técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.397), técnicas de fusión entre células (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.916.771), entre otras. En la técnica de fusión entre células, se prepara una línea celular de mieloma u otro tipo que posee una cadena pesada con cualquier isotipo deseado y se prepara otro mieloma u otra línea celular que posee la cadena ligera. Dichas células pueden, posteriormente, fusionarse y puede aislarse una línea celular que expresa un anticuerpo intacto.

En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo dirigida contra GCC es un anticuerpo IgG1 humano anti-GCC. Ya

que dichos anticuerpos poseen unión deseada a la molécula de GCC, puede intercambiarse fácilmente el isotipo de uno cualquiera de dichos anticuerpos para generar un isotipo IgG4 humano, por ejemplo, mientras que sigue poseyendo la misma región variable (lo que define la especificidad y afinidad del anticuerpo, hasta cierto punto). Por consiguiente, a medida que se generan candidatos de anticuerpo que cumplen con los atributos "estructurales" deseados analizados anteriormente, generalmente pueden proporcionarse con al menos ciertos atributos "funcionales" adicionales que son deseados mediante intercambio de isotipo.

En una realización, puede acoplarse la región variable o el fragmento de unión a antígeno de la misma a una región constante (o un fragmento de la misma) distinta de la región constante con la que se generó, por ejemplo, una región constante (o fragmento de la misma) de otro anticuerpo o a una región constante sintética (o un fragmento de la misma). En algunas realizaciones, la región constante es una región constante de IgG1 o IgG2 (o un fragmento de la misma). Pueden efectuarse cambios de secuencia en las regiones variables o constantes para modificar la actividad efectora de la molécula de anticuerpo.

15 Diseño y generación de otros agentes terapéuticos

Los anticuerpos que se producen y caracterizan en el presente documento con respecto a GCC posibilitan el diseño de otras modalidades terapéuticas, incluyendo otros anticuerpos, otros antagonistas o restos químicos distintos de anticuerpos. Dichas modalidades incluyen, sin limitación, anticuerpos que tienen una actividad o funcionalidad de unión similar, agentes terapéuticos de anticuerpo avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunconjugados y agentes terapéuticos radiomarcados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, particularmente intracuerpos y moléculas pequeñas. Además, como se analizó anteriormente, puede cambiarse la función efectora de los anticuerpos de la invención mediante intercambio de isotipo a una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

En relación con los anticuerpos biespecíficos, pueden generarse anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad por GCC y otro para una segunda molécula que se conjugan entre sí, (ii) un solo anticuerpo que tiene una cadena específica para GCC y una segunda cadena específica para una segunda molécula o (iii) un anticuerpo monocatenario que tiene especificidad por GCC y la otra molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos pueden generarse usando técnicas que son conocidas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos biespecíficos reticulando dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes). Los reticulantes adecuados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos que reaccionan de manera distinta separados por un espaciador adecuado (por ejemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidrosuccinimida) u homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos enlazadores se encuentran disponibles de Pierce Chemical Company, Rockford, IL. Véase también, por ejemplo, Fanger et al. Immunomethods 4:72-81 (1994) y Winter y Harris Immunol Today 14:43-46 (1993) y Wright et al. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992) y en relación con (iii), véase, por ejemplo, Traunecker et al. Int. J. Cancer (Supl.) 7:51-52 (1992). Songsivilai y Lachmann Clin. Exp. Immunol. 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. J. Immunol. 148:1547-1553 (1992).

Además, también pueden prepararse "kappacuerpos" (Ill. et al. "Design and construction of a hybrid immunoglobulin domain with properties of both heavy and light chain variable regions" Protein Eng 10:949-57 (1997)), "minicuerpos" (Martin et al. EMBO J 13:5303-9 (1994), Patente de los Estados Unidos n.º 5.837.821), "diacuerpos" (Holliger et al. Proc Natl Acad Sci USA 90:6444-6448 (1993)) o "janusinas" (Traunecker et al. EMBO J 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al. Int J Cancer Suppl 7:51-52 (1992)).

45 Ácidos nucleicos y polipéptidos

En otra realización, la presente invención se refiere a secuencias de polinucleótido y polipéptido que codifican o representan las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento. Dichos polinucleótidos codifican las regiones tanto variables como constantes de cada una de las cadenas pesada y ligera, aunque también se contemplan otras combinaciones por la presente invención de acuerdo con las composiciones descritas en el presente documento. La presente invención también contempla fragmentos de oligonucleótidos derivados de los polinucleótidos divulgados y secuencias de ácido nucleico complementarias a estos polinucleótidos.

Los polinucleótidos pueden encontrarse en forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en forma de ADN, ADNc, ADN genómico, análogos de ácidos nucleicos y ADN sintético se encuentran dentro del alcance de la presente invención. El ADN puede ser bicatenario o monocatenario y en caso de ser monocatenario, puede ser la hebra codificante (sentido) o la hebra no codificante (antisentido). La secuencia codificante que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia codificante proporcionada en el presente documento o puede ser una secuencia codificante diferente, en donde dicha secuencia codificante, como resultado de la redundancia y degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que el ADN proporcionado en el presente documento.

La presente divulgación describe que, los polinucleótidos codifican al menos una región variable de cadena pesada y al menos una región variable de cadena ligera de la presente invención, por ejemplo, como se resume en la tabla 4.

La presente divulgación también incluye polinucleótidos variantes que contienen modificaciones, tales como

eliminaciones, sustituciones o adiciones de polinucleótidos y cualquier modificación del polipéptido resultante de la secuencia de polinucleótido variante. Un polinucleótido de la presente divulgación también puede tener una secuencia codificante que es una variante de la secuencia codificante proporcionada en el presente documento. Por ejemplo, un polinucleótido variante puede tener al menos un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % de identidad respecto de un polinucleótido listado en la tabla 4. En algunas realizaciones, el polinucleótido variante codifica una molécula de anticuerpo anti-GCC.

La presente divulgación se refiere además a polipéptidos que representan los anticuerpos de la presente invención, así como fragmentos, análogos y derivados de dichos polipéptidos. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos producidos de manera natural o polipéptidos sintéticos. El fragmento, derivado o análogo de los polipéptidos de la presente divulgación puede ser uno en el que se sustituyen uno o más de los restos de aminoácido con un resto de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente, un resto de aminoácido conservado) y dicho resto de aminoácido sustituido puede estar o no codificado por el código genético; o puede ser uno en el que uno o más de los restos de aminoácido incluye un grupo sustituyente; o puede ser uno en el que el polipéptido se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o puede ser uno en el que se fusionan aminoácidos adicionales al polipéptido, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido o una secuencia de proteína. En diversos aspectos, los polipéptidos de la invención pueden ser un producto parcialmente purificado o purificado.

Un polipéptido de la presente divulgación puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, resumida en las tablas 2 o 3 o que es diferente, salvo por variaciones menores debido a una o más sustituciones de aminoácidos. La variación puede ser un "cambio conservativo" normalmente en el intervalo de 1 a 5 aminoácidos, en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, reemplazo de leucina con isoleucina o de treonina con serina; reemplazo de lisina con arginina o histidina. Por el contrario, las variaciones pueden incluir cambios no conservativos, por ejemplo, reemplazo de una glicina con un triptófano. Las variaciones menores similares también pueden incluir eliminaciones o inserciones de aminoácidos o ambas. Puede encontrarse orientación a la hora de determinar qué y cuántos restos de aminoácido pueden sustituirse, insertarse o eliminarse sin cambiar la actividad biológica o inmunológica usando programas informáticos conocidos en la técnica, por ejemplo, el programa DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.).

En otro aspecto, la invención presenta ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican moléculas de anticuerpo anti-GCC. En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos codifican uno o más de una molécula de anticuerpo, una cadena pesada, una cadena ligera, una región variable de cadena ligera, una región variable de cadena pesada, porciones de las cadenas ligeras y las cadenas pesadas de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento (por ejemplo, un fragmento de región variable de cadena ligera que, cuando se empareja con una región variable de cadena pesada de longitud completa se une al antígeno o un fragmento de región variable de cadena pesada que cuando se empareja con una región variable de cadena ligera de longitud completa, se une al antígeno) y CDR. Las realizaciones incluyen dichos ácidos nucleicos dispuestos en vectores, por ejemplo, vectores de expresión. En realizaciones específicas, la invención incluye los plásmidos pTOK58D-5F9LC y pTOK58D-5F9HC. Además, la invención abarca moléculas de anticuerpo producidas por células hospedadoras, por ejemplo, que expresan las moléculas de anticuerpo codificadas por los plásmidos pTOK58D-5F9LC y pTOK58D-5F9HC.

En una realización, se proporciona un vector, por ejemplo, un vector de expresión, que comprende uno o ambos de:

secuencias que codifican una región variable de cadena ligera, por ejemplo, las secuencias listadas en la tabla 4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una, dos o tres CDR de una cadena ligera (y opcionalmente, una región marco), descrita en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 6; y

secuencias que codifican una región variable de cadena pesada, por ejemplo, las secuencias listadas en la tabla 4, un fragmento de unión a antígeno del mismo o una, dos o tres CDR de una cadena pesada (y opcionalmente, una región marco), descrita en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 6.

En las realizaciones proporcionadas, los polinucleótidos codifican al menos una región variable de cadena pesada o al menos una región variable de cadena ligera de los anticuerpos de la presente invención. En las realizaciones proporcionadas, los polipéptidos pueden codificar al menos una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera de los anticuerpos de la presente invención.

La presente divulgación describe que la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende uno o ambos de:

(a) una región variable de cadena ligera o un fragmento de unión a antígeno de la misma, codificada por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad seleccionadas con, (i) el complemento de una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 4 o (ii) cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena ligera de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, el anticuerpo 5F9, como se muestra en las tablas 1 y 2; y

(b) una región variable de cadena pesada o un fragmento de unión a antígeno de la misma, codificada por un ácido nucleico que hibrida en condiciones de rigurosidad seleccionadas con, (i) el complemento de una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento, por ejemplo, en la tabla 4 o (ii) cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena pesada de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, el anticuerpo 5F9, como se muestra en las tablas 1 y 2.

En una realización, las condiciones de rigurosidad seleccionadas son condiciones de alta rigurosidad o de muy alta rigurosidad, por ejemplo, como se describen estas condiciones en el presente documento.

En aspectos adicionales, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de región variable de cadena ligera del anticuerpo codificado por el ADN que tiene el número de referencia de la ATCC PTA-8132. En otros aspectos adicionales, el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la secuencia de región variable de cadena pesada del anticuerpo codificado por el ADN que tiene el número de referencia de la ATCC PTA-8132.

La presente invención también proporciona vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención, células hospedadoras que se modifican por ingeniería genética con vectores de la presente invención y la producción de los anticuerpos de la presente invención mediante técnicas recombinantes.

Puede insertarse la secuencia de ADN adecuada en el vector mediante diversos procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en sitios de endonucleasa de restricción adecuados mediante procedimientos conocidos en la técnica. La secuencia de polinucleótido en el vector de expresión está unida operativamente a una secuencia de control de la expresión adecuada (es decir, un promotor) para dirigir la síntesis de ARNm. Los ejemplos de dichos promotores incluyen, pero sin limitación, la LTR del virus de sarcoma de Rous o el promotor temprano o tardío de SV40, lac o trp de *E. coli*, el promotor Pl de fago lambda y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariontes (por ejemplo, los promotores tac, T3, T7 para *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, promotor de citomegalovirus, promotor tardío de adenovirus, promotor EF-1a) o sus virus. El vector de expresión también contiene un sitio de unión a ribosomas para el inicio de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias adecuadas para amplificar la expresión. Por ejemplo, el vector puede contener potenciadores, que son secuencias de ADN estimuladoras de la transcripción de origen vírico, tales como las derivadas de virus de simio, tales como SV40, virus del poliovirus, citomegalovirus, virus del papiloma bovino o virus del sarcoma de Moloney o de origen genómico. El vector también comprende preferentemente un origen de replicación. El vector puede construirse para que contenga un origen de replicación exógeno o, dicho origen de replicación puede derivarse de SV40 u otra fuente vírica o por el mecanismo de replicación cromosómica de la célula hospedadora.

Además, los vectores contienen opcionalmente un gen marcador para la selección de células hospedadoras transfectadas, tales como genes marcadores de dihidrofolato reductasa para permitir la selección con metotrexato en una variedad de hospedadores o anticuerpos, tales como el gen de β -lactamasa (resistencia a la ampicilina), el gen *Tet* (para resistencia a tetraciclina) usado en células procariontes o genes de resistencia a neomicina, GA418 (geneticina, un derivado de la neomicina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina o genes que complementan una lesión genética de las células hospedadoras, tales como la ausencia de timidina cinasa, hipoxantina fosforibosil transferasa, dihidrofolato reductasa, etc. Los genes que codifican el producto génico de marcadores auxótrofos del hospedador (por ejemplo, *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) normalmente se usan como marcadores de selección en levaduras.

Para obtener los anticuerpos de la presente invención, deben incorporarse en un vector una o más secuencias de polinucleótido que codifican las regiones variables de cadena ligera y pesada y las regiones constantes de cadena ligera y pesada de los anticuerpos de la presente invención. Las secuencias de polinucleótido que codifican las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos de la presente invención pueden incorporarse en uno o múltiples vectores y después se incorporan en las células hospedadoras.

Los vectores de expresión para la expresión en células de mamífero incluyen, por ejemplo, pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., et al., *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GIBCO, división de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pEF-Bos (Mizushima, S., et al., *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)), retrovector GPEX® bicistrónico (Gala Biotech, Middleton, WI) y similares. Los vectores de expresión que son adecuados para su uso en diversos hospedadores de expresión, tales como células procariontes (*E. coli*), células de insecto (células de *Drosophila* Schnieder S2, Sf9) y levadura (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) también se encuentran disponibles. Los vectores ejemplares son pLKTOK58 (secuencia de Fc de IgG1 de tipo silvestre) y pLKTOK59 (secuencia de Fc de IgG1 mutada) (véase la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 20060147445).

Como se apreciará, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención pueden expresarse en líneas celulares distintas de líneas celulares de hibridoma. Las secuencias que codifican los ADNc o clones genómicos para los anticuerpos particulares pueden usarse para células hospedadoras de mamífero o de no mamífero adecuadas. La

transformación puede ser mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, el empaquetado del polinucleótido en un virus (o en un vector vírico) y transduciendo una célula hospedadora con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en la técnica, para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas y microinyección directa de la molécula de ADN. El procedimiento de transformación usado depende del hospedador que se vaya a transformar. Se conocen en la técnica métodos para la introducción de polinucleótidos heterólogos en células de mamífero e incluyen, pero sin limitación, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, bombardeo de partículas, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, conjugados peptídicos, dendrímeros y microinyección directa del ADN en los núcleos.

En otro aspecto, la invención presenta, una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la célula expresa una molécula de anticuerpo o el complemento de la misma, descrita en el presente documento. Otra realización adicional proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humana o humanizada que comprende mantener la célula hospedadora en condiciones adecuadas para la expresión, mediante lo cual se expresan las cadenas de inmunoglobulina y se produce una molécula de anticuerpo. Una realización adicional proporciona una célula hospedadora que comprende cualquiera de los vectores de expresión anteriores que codifican secuencias de anticuerpo de cadena pesada y ligera. La célula hospedadora puede ser una célula eucariota, por ejemplo, una célula de mamífero, una célula de insecto, una célula de levadura o una célula procariota, por ejemplo, *E. coli*. Por ejemplo, la célula de mamífero puede ser una célula cultivada o una línea celular. Las células de mamífero ejemplares incluyen líneas celulares linfocíticas (por ejemplo, NS0), células de ovario de hámster chino (CHO), células COS. En una realización particular, la célula hospedadora cultivada es una célula COS que comprende secuencias de ácido nucleico que codifican una molécula de anticuerpo 5F9. En otra realización, la célula hospedadora es el hibridoma 5F9 (PTA-8132). Además, las células incluyen ovocitos y células de un animal transgénico, por ejemplo, células epiteliales mamarias. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento pueden expresarse en un animal transgénico no humano.

Las líneas celulares de mamífero disponibles como hospedadores para la expresión se conocen en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tip (ATCC), incluyendo, pero sin limitación, células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y una serie de líneas celulares diferentes. También pueden usarse células de no mamífero que incluyen, pero sin limitación, bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales, para expresar anticuerpos recombinantes. Puede preferirse la mutagénesis de sitio dirigido del dominio CH2 de anticuerpo para eliminar la glucosilación a fin de prevenir cambios o bien en la inmunogenicidad, la farmacocinética y/o las funciones efectoras resultantes de la glucosilación no humana. Los métodos de expresión se seleccionan determinando qué sistema genera los mayores niveles de expresión y producen anticuerpos con propiedades de unión a GCC constitutivas.

Otra realización adicional proporciona un método para producir una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humana o humanizada, que comprende mantener la célula hospedadora que comprende ácidos nucleicos descritos en el presente documento, por ejemplo, una o más secuencias de ácido nucleico listadas en la tabla 4 o 6, en condiciones adecuadas para la expresión de una inmunoglobulina, mediante lo cual se expresan cadenas de inmunoglobulina y se produce una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humana o humanizada que se une a GCC o un fragmento o variante del mismo. Por ejemplo, los métodos de expresión de moléculas de anticuerpo incluyen el uso de células hospedadoras en donde una primera molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una cadena ligera de anticuerpo humana o humanizada y una segunda molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una cadena pesada de anticuerpo humana o humanizada, están comprendidas en un solo vector de expresión. En otras realizaciones, se encuentran en vectores separados. El método puede comprender además la etapa de aislar o recuperar el anticuerpo, el fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo, la cadena de anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno de una cadena de anticuerpo, si se desea.

Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (es decir, una o más moléculas de ácido nucleico) que codifica las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano que se une a una proteína GCC o una construcción de expresión (es decir, una o más construcciones) que comprende dichas moléculas de ácido nucleico, puede introducirse en una célula hospedadora adecuada para crear una célula hospedadora recombinante usando cualquier método adecuado para la célula hospedadora seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de tal forma que las moléculas de ácido nucleico se unen operativamente a uno o más elementos de control de la expresión (por ejemplo, en un vector, en una construcción creada mediante procesos en la célula, integrada en el genoma de la célula hospedadora). La célula hospedadora recombinante resultante puede mantenerse en condiciones adecuadas para la expresión (por ejemplo, en presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en medio de cultivo adecuado suplementado con sales adecuadas, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales, etc.), mediante lo cual se producen los polipéptidos codificados. Si se desea, la proteína codificada puede aislarse o

recuperarse (por ejemplo, del animal, la célula hospedadora, medio, leche). Este proceso abarca la expresión en una célula hospedadora de un animal transgénico no humano (véase, por ejemplo, el documento WO 92/03918, GenPharm International) o la planta.

5 Además, puede potenciarse la expresión de anticuerpos de la invención (u otros restos de los mismos) a partir de líneas celulares de producción usando una serie de técnicas conocidas. Por ejemplo, los sistemas de expresión de glutamina sintetasa y de DHFR son enfoques comunes para potenciar la expresión en ciertas condiciones. Se pueden identificar clones con alta expresión usando técnicas convencionales, tales como clonación de dilución limitante, tecnología de microgotas o cualquier otro método conocido en la técnica. El sistema GS se analiza, en totalidad o en parte, en relación con las Patentes Europeas n.º 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y la Solicitud de Patente Europea n.º 89303964.4.

15 En un sistema ejemplar para la expresión recombinante de un anticuerpo modificado o una porción de unión a antígeno del mismo, de la invención, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo en células dhfr-CHO mediante transfección mediada por fosfato de calcio. En el vector de expresión recombinante, cada uno de los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo se unen operativamente a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados de SV40, CMV, adenovirus y similares, tal como el elemento regulador de potenciador/promotor de AdMLP de CMV o un elemento regulador de potenciador/promotor de AdMLP de SV40) para impulsar altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también porta un gen de DHFR, que permite la selección de células CHO que se han transfectado con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células hospedadoras transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y se recupera el anticuerpo intacto del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular convencionales para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células hospedadoras, seleccionar los transformantes, cultivar las células hospedadoras y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

20 También pueden producirse anticuerpos de la invención de manera transgénica mediante la generación de un mamífero o una planta que es transgénico para las secuencias de cadena pesada y ligera de inmunoglobulina de interés y la producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir del mismo. En relación con la producción transgénica en mamíferos, pueden producirse anticuerpos y recuperarse de, la leche de cabras, vacas u otros mamíferos. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5.741.957.

30 Los anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno, cadenas de anticuerpo y porciones de unión a antígeno de los mismos descritos en el presente documento también pueden producirse en un sistema de expresión *in vitro* adecuado, mediante síntesis química o mediante cualquier otro método adecuado.

Proteínas de fusión e inmunoconjugados

40 Los anticuerpos anti-GCC descritos en el presente documento pueden ligarse funcionalmente mediante cualquier método adecuado (por ejemplo, acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares distintas de un anticuerpo.

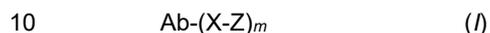
45 Pueden producirse proteínas de fusión en las que una molécula de anticuerpo anti-GCC como se describe en el presente documento y un resto distinto de un anticuerpo son componentes de una sola cadena de polipéptido continua. El resto distinto de un anticuerpo puede estar ubicado en N-terminal, C-terminal o internamente, con respecto al resto de anticuerpo. Por ejemplo, algunas realizaciones pueden producirse mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica secuencias de inmunoglobulina en un vector de expresión adecuado, tal como un vector pET (por ejemplo, pET-15b, Novagen), un vector de fago (por ejemplo, pCNATAB 5 E, Pharmacia) u otro vector, por ejemplo, vector de fusión de proteína A pRIT2T, Pharmacia). La construcción resultante puede expresarse para producir cadenas de anticuerpo que comprenden un resto distinto de un anticuerpo (por ejemplo, marcador de histidina, marcador E o dominio de unión a IgG de proteína A). Las proteínas de fusión pueden aislarse o recuperarse usando cualquier técnica adecuada, tal como cromatografía usando una matriz de afinidad adecuada (véase, por ejemplo, Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M et al., eds., Vol. 2, Supl. 26, págs. 16.4.1-16.7.8 (1991)).

55 La invención proporciona moléculas de anticuerpo anti-GCC que se dirigen a y, en algunas realizaciones, se internalizan en células. Tienen la capacidad de suministrar agentes terapéuticos o agentes detectables a o en células que expresan GCC, pero no a o dentro de células donde no se expresa la diana. Por lo tanto, la invención también proporciona inmunoconjugados anti-GCC que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC como se describe en el presente documento, que se conjuga a un agente terapéutico o a un agente detectable. En algunas realizaciones, la afinidad por GCC de un inmunoconjugado anti-GCC es al menos un 10, 25, 50, 75, 80, 90 o un 95 % de la de un anticuerpo no conjugado. Esto puede determinarse usando GCC en la superficie celular o GCC aislada. En una realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un inmunoconjugado, tiene una DL50, determinada mediante un ensayo descrito en el presente documento, de menos de 1.000, 500, 250, 100 o 50 pM.

65 La molécula de anticuerpo anti-GCC puede modificarse para que actúe como un inmunoconjugado utilizando técnicas que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Vitetta Immunol Today 14:252 (1993). Véase también la Patente

de los Estados Unidos n.º 5.194.594. La preparación de anticuerpos radiomarcados también puede prepararse fácilmente utilizando técnicas que se conocen en la técnica. Véase, por ejemplo, Junghans et al. en *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2.ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también las Patentes de los Estados Unidos n.º 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827 y 5.102.990 (Patente Re. de los Estados Unidos n.º 35.500), 5.648.471 y 5.697.902.

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo y el resto distinto de anticuerpo se conectan mediante un enlazador. En dichas realizaciones, el inmunoconjugado está representado por la fórmula (I):



en donde,

Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento;

X es un resto que conecta Ab y Z, por ejemplo, el resto de un enlazador descrito en el presente documento después de la unión covalente a uno o ambos de Ab y Z;

Z es un agente terapéutico o un marcador; y

m varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 15.

La variable m representa el número de restos -X-Z por molécula de anticuerpo en un inmunoconjugado de fórmula (I). En diversas realizaciones, m varía de 1 a 15, de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3 o de 1 a 2. En algunas realizaciones, m varía de 2 a 10, de 2 a 9, de 2 a 8, de 2 a 7, de 2 a 6, de 2 a 5, de 2 a 4 o de 2 a 3. En otras realizaciones, m es 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En composiciones que comprenden una pluralidad de inmunoconjugados de fórmula (I), m es el número medio de restos -X-Z por Ab, también denominado como la carga media de fármaco. La carga media de fármaco puede variar de 1 a aproximadamente 15 restos -X-Z por Ab. En algunas realizaciones, cuando m representa la carga media de fármaco, m es aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7 o aproximadamente 8. En realizaciones ejemplares, m es de aproximadamente 2 a aproximadamente 8. En una realización, m es aproximadamente 8. En otra realización, m es aproximadamente 4. En otra realización, m es aproximadamente 2.

El número medio de restos -X-Z por Ab puede caracterizarse por medios convencionales, tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA y HPLC. También puede determinarse la distribución cuantitativa de inmunoconjugados en términos de m . En algunos casos, la separación, purificación y caracterización de inmunoconjugados homogéneos donde m es un valor concreto, diferenciados de los inmunoconjugados con otras cargas de fármaco, pueden lograrse por medios tales como HPLC en fase reversa o electroforesis.

Los inmunoconjugados de fórmula (I) pueden existir como mezclas, en donde cada componente de la mezcla tiene un valor de m diferente. Por ejemplo, un inmunoconjugado de fórmula (I) puede existir en forma de una mezcla de dos componentes inmunoconjugados separados: un componente inmunoconjugado en donde m es 7 y el otro componente inmunoconjugado en donde m es 8.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 1, 2 y 3, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 3, 4 y 5, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 5, 6 y 7, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 7, 8 y 9, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 9, 10 y 11, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 11, 12 y 13, respectivamente.

En una realización, el inmunoconjugado de fórmula (I) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados en donde m para los tres inmunoconjugados separados es 13, 14 y 15, respectivamente.

Se conocen en la técnica una variedad de enlazadores adecuados (por ejemplo, reactivos heterobifuncionales para conectar una molécula de anticuerpo a un agente terapéutico o marcador) y métodos para preparar inmunoconjugados. (Véase, por ejemplo, Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992)). El enlazador puede ser escindible, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en condiciones intracelulares, de tal forma que la escisión del enlazador libera el fármaco (agente terapéutico o marcador) en el ambiente intracelular. En otras realizaciones, el enlazador es no escindible y el fármaco se libera, por ejemplo, mediante degradación de anticuerpos.

El enlazador puede unirse a un grupo químicamente reactivo en el resto de anticuerpo, por ejemplo, a un grupo amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo libre (por ejemplo, al extremo N o C-terminal, al grupo amino épsilon de uno o más restos de lisina, el grupo ácido carboxílico libre de uno o más restos de ácido glutámico o ácido aspártico o al grupo sulfhidrilo de uno o más restos de cisteinilo). El sitio al que se une el enlazador puede ser un resto natural en la secuencia de aminoácidos del resto de anticuerpo o puede introducirse en el resto de anticuerpo, por ejemplo, mediante tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, introduciendo una cisteína o un sitio de escisión de proteasa en la secuencia de aminoácidos) o mediante bioquímica de proteínas (por ejemplo, reducción, ajuste del pH o proteólisis).

Uno de los métodos no específicos más comúnmente usados de unión covalente es la reacción de carbodiimida para ligar un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a un grupo amino (o carboxi) de la molécula de anticuerpo. Además, se han usado agentes bifuncionales, tales como dialdehídos o imidoésteres para ligar el grupo amino de un compuesto a grupos amino de una molécula de anticuerpo. Para la unión de fármacos a moléculas de anticuerpo también se encuentra disponible la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, formando de este modo un aldehído que después se hace reaccionar con la molécula de anticuerpo. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula de anticuerpo. También pueden usarse isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente fármacos a moléculas de anticuerpo. Los expertos en la materia conocen otras técnicas y estas se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

En ciertas realizaciones, un intermedio, que es el precursor del enlazador (X), se hace reaccionar con el fármaco (Z) en condiciones adecuadas. En ciertas realizaciones, se usan grupos reactivos sobre el fármaco y/o el intermedio. El producto de la reacción entre el fármaco y el intermedio o el fármaco derivatizado, se hace reaccionar posteriormente con la molécula de anticuerpo en condiciones adecuadas.

El inmunoconjugado puede purificarse a partir de reactivos empleando metodologías bien conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de interacción hidrófoba), diálisis, diafiltración o precipitación. El inmunoconjugado puede evaluarse empleando metodologías bien conocidas por los expertos en la materia, por ejemplo, SDS-PAGE, espectroscopía de masas o electroforesis capilar.

En algunas realizaciones, el enlazador es escindible por un agente de escisión que está presente en el ambiente intracelular (por ejemplo, en un lisosoma o endosoma o caveola). El enlazador puede ser, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que se escinde por una enzima peptidasa o proteasa intracelular, incluyendo, pero sin limitación, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico es de al menos dos aminoácidos de longitud o de al menos tres aminoácidos de longitud. Los agentes de escisión pueden incluir cathepsina B y D y plasmina, que se sabe que hidrolizan derivados de fármaco de dipéptido, dando como resultado la liberación del fármaco activo dentro de las células diana (véase, por ejemplo, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son enlazadores de peptidilo que son escindibles por enzimas que están presentes en células que expresan GCC. Por ejemplo, puede usarse un enlazador de peptidilo que es escindible por la proteasa cathepsina B dependiente de tiol, que está altamente expresada en tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador de Phe-Leu o de Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 319)). Otros ejemplos de dichos enlazadores se describen, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos n.º 6.214.345. En una realización específica, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador de Val-Cit o un enlazador de Phe-Lys (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos 6.214.345, que describe la síntesis de doxorubicina con el enlazador Val-Cit). Una ventaja del uso de la escisión proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente normalmente se atenúa cuando se conjuga y la estabilidad en suero de los conjugados es normalmente elevada.

En otras realizaciones, el enlazador escindible es sensible al pH, es decir, sensible a la hidrólisis a determinados valores de pH. Normalmente, el enlazador sensible al pH es hidrolizable en condiciones ácidas. Por ejemplo, puede usarse un enlazador lábil por ácidos que es hidrolizable en el lisosoma (por ejemplo, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-acotínica, ortoéster, acetal, cetal o similares). (Véanse, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.122.368; 5.824.805; 5.622.929; Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al, 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Dichos enlazadores son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tales como las de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas realizaciones, el enlazador hidrolizable es un enlazador de tioéter (tal como, por ejemplo, un tioéter acoplado al agente terapéutico mediante un enlace de acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.622.929).

En otras realizaciones más, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador de disulfuro). En la técnica se conoce una diversidad de enlazadores disulfuro, incluyendo, por ejemplo, aquellos que pueden formarse usando SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridil-ditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno), SPDB y SMPT (véase, por ejemplo, Thorpe et al., 1987, Cancer Res. 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., en *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Véase también la Patente de los Estados Unidos n.º 4.880.935).

En otras realizaciones específicas, el enlazador es un enlazador de malonato (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15: 1387-93), un enlazador de maleimidobenzóilo (Lau et al., 1995, *Bioorg Med Chem.* 3(10):1299-1304) o un análogo de 3'-N-amida (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3 (10): 1305-12).

En otras realizaciones más, la unidad de anticuerpo no es escindible y el fármaco se libera mediante degradación del anticuerpo. (Véase, por ejemplo, la Publicación de los Estados Unidos n.º 20050238649).

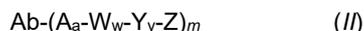
Normalmente, el enlazador es sustancialmente no sensible al ambiente extracelular. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente no sensible al ambiente extracelular", en el contexto de un enlazador, significa que no más de aproximadamente un 20 %, normalmente no más de aproximadamente un 15 %, más típicamente no más de aproximadamente un 10 % y aún más típicamente no más de aproximadamente un 5 %, no más de aproximadamente un 3 % o no más de aproximadamente un 1 % de los enlazadores, en una muestra de inmunoconjugado, se escinden cuando el inmunoconjugado se presenta en un ambiente extracelular (por ejemplo, en plasma). Puede determinarse si un enlazador no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular, por ejemplo, incubando el inmunoconjugado con plasma durante un periodo de tiempo predeterminado (por ejemplo, 2, 4, 8, 16 o 24 horas) y después se cuantifica la cantidad de fármaco libre presente en el plasma.

En otras realizaciones no mutuamente excluyentes, el enlazador promueve la internalización celular. En ciertas realizaciones, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga al agente terapéutico o al marcador (Z). En otras realizaciones más, el enlazador promueve la internalización celular cuando se conjuga tanto al resto Z como a la molécula de anticuerpo anti-GCC.

Una variedad de enlazadores ejemplares que pueden usarse con las presentes composiciones y métodos se describe en el documento WO 2004-010957, la Publicación de los Estados Unidos n.º 20060074008, la Publicación de los Estados Unidos n.º 20050238649 y la Publicación de los Estados Unidos n.º 20060024317.

Los ejemplos de enlazadores capaces de usarse para acoplar una molécula de anticuerpo a un agente o marcador terapéutico incluyen, por ejemplo, enlazadores de maleimidocaproilo (mc); maleimidocaproil-*p*-aminobencilcarbamato; maleimidocaproil-peptidoaminobencilcarbamato, por ejemplo, maleimidocaproil-L-fenilalanina-L-lisina-*p*-aminobencilcarbamato y maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato (vc); 3-(2-piridil-ditio)propionato de N-succinimidilo (también conocido como 4-(2-piridil-ditio)pentanoato de N-succinimidilo o SPP); 4-succinimidil-oxycarbonil-2-metil-2-(2-piridil-ditio)-tolueno (SMPT); 3-(2-piridil-ditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP); 4-(2-piridil-ditio)butirato de N-succinimidilo (SPDB); 2-iminotiolano; anhídrido S-acetilsuccínico; bencil carbamato de disulfuro; carbonato; enlazadores de hidrazona; éster de N-(α -maleimidoacetoxi)succinimida; N-[4-(*p*-azidosalicilamido)butil]-3'-(2'-piridil-ditio)propionamida (AMAS); éster de N-[β -maleimidopropiloxi]succinimida (BMPS); éster de [N- ϵ -maleimidocaproiloxi]succinimida (EMCS); éster de N-[γ -maleimidobutiriloxi]succinimida (GMBS); succinimidil-4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi-[6-amidocaproato] (LC-SMCC); 6-(3-[2-piridil-ditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP); éster de *m*-maleimidobenzóil-N-hidroxisuccinimida (MBS); N-succinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato (SIAB); 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC); 3-[2-piridil-ditio]-propionamido de N-succinimidilo (SPDP); éster de [N- ϵ -maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida (Sulfo-EMCS); éster de N-[γ -maleimidobutiriloxi]sulfosuccinimida (Sulfo-GMBS); 4-sulfosuccinimidil-6-metil- α -(2-piridil-ditio)toluamido]hexanoato (Sulfo-LC-SMPT); 6-(3'-(2-piridil-ditio)-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SPDP); éster de *m*-maleimidobenzóil-N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-MBS); N-sulfosuccinimidil[4-yodoacetil]aminobenzoato (Sulfo-SIAB); 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMCC); 4-[*p*-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMPB); etilenglicol-bis(N-hidroxisuccinimidil éster del ácido succínico) (EGS); tartrato de disuccinimidilo (DST); ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA); ácido dietilentriamina-pentaacético (DTPA); y enlazadores de tiourea.

En algunas realizaciones, el enlazador -X- tiene la fórmula -A_a-W_w-Y_y- y el inmunoconjugado de fórmula (I) se caracteriza por la fórmula (II):



en donde,

Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento;

-A- es una Unidad ensanchadora;

a es 0 o 1;

cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;

w es un número entero de 0 a 12;

-Y- es una unidad espaciadora autoinmolable;

y es 0, 1 o 2;

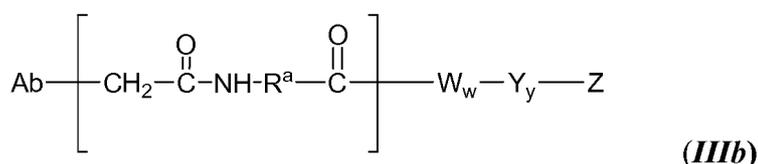
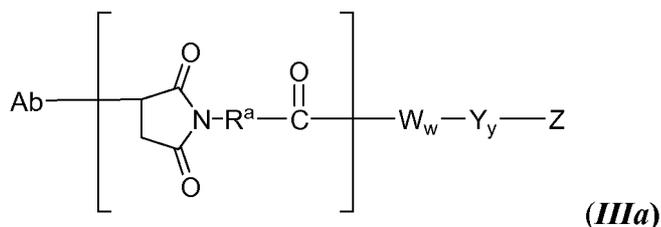
Z es un agente terapéutico o un marcador; y

m varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 15.

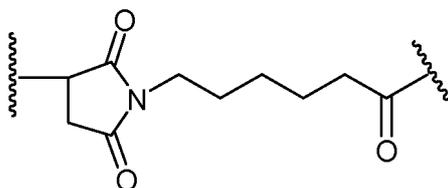
La unidad ensanchadora (A), cuando está presente, tiene la capacidad de unir una unidad de Ab a una unidad de aminoácido (-W-), en caso de estar presente, a una unidad espaciadora (-Y-), si está presente; o a un agente terapéutico o marcador (Z). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una molécula de anticuerpo anti-GCC, tanto naturalmente como mediante manipulación química incluyen, pero sin limitación, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato y carboxilo. Los grupos funcionales adecuados son sulfhidrilo y amino. En un ejemplo, pueden generarse grupos sulfhidrilo mediante reducción de los enlaces disulfuro intramoleculares de una molécula de anticuerpo anti-GCC. En otra realización, pueden generarse grupos sulfhidrilo mediante reacción de un grupo amino de un resto de lisina de una molécula de anticuerpo anti-GCC con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo. En ciertas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo recombinante y se modifica por ingeniería genética para que porte una o más lisinas. En ciertas realizaciones diferentes, la molécula de anticuerpo recombinante anti-GCC se modifica por ingeniería genética para portar grupos sulfhidrilo adicionales, por ejemplo, cisteínas adicionales.

En una realización, la unidad ensanchadora forma un enlace con un átomo de azufre de la unidad de Ab. El átomo de azufre puede derivarse de un grupo sulfhidrilo de un Ab. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las fórmulas (IIIa) y (IIIb), en donde Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son como se han definido anteriormente y R^a se selecciona entre -alquilenilo C₁-C₁₀-, -alquenileno C₂-C₁₀-, -alquinileno C₂-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquilenilo C₁-C₈)-, -O-(alquenileno C₂-C₈)-, -O-(alquinileno C₂-C₈)-, -arileno-, -alquilen C₁-C₁₀-arileno, -alquenilen C₂-C₁₀-arileno, -alquinilenarileno C₂-C₁₀, -arilen-alquilenilo C₁-C₁₀-, -arilen-alquenileno C₂-C₁₀-, -arilen-alquinileno C₂-C₁₀-, -alquilen C₁-C₁₀-(carbociclo)-, -alquenilen C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -alquinilen C₂-C₁₀-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquilenilo C₁-C₁₀-, -(carbociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(carbociclo)-alquinileno C₂-C₁₀, heterociclo-, -alquilen C₁-C₁₀-(heterociclo)-, -alquenilen C₂-C₁₀-(heterociclo)-, -alquinilen C₂-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquilenilo C₁-C₁₀-, -(heterociclo)-alquenileno C₂-C₁₀-, -(heterociclo)-alquinileno C₂-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r- o -(CH₂CH₂O)_r-CH₂- y r es un número entero en el intervalo de 1-10, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbocilo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya estén solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos. En algunas realizaciones, dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenileno, alquinileno, arilo, carbocilo, carbociclo, heterociclo y arileno, ya estén solos o como parte de otro grupo, están sin sustituir. En algunas realizaciones, R^a se selecciona entre -alquilenilo C₁-C₁₀-, -carbociclo-, -O-(alquilenilo C₁-C₈)-, -arileno-, -alquilen C₁-C₁₀-arileno, -arilen-alquilenilo C₁-C₁₀-, -alquilen C₁-C₁₀-(carbociclo)-, -(carbociclo)-alquilenilo C₁-C₁₀-, -heterociclo C₃-C₈, -alquilen C₁-C₁₀-(heterociclo)-, -(heterociclo)-alquilenilo C₁-C₁₀-, -(CH₂CH₂O)_r- y -(CH₂CH₂O)_r-CH₂-; y r es un número entero en el intervalo de 1-10, en donde dichos grupos alquilenilo están sin sustituir y el resto de los grupos están opcionalmente sustituidos.

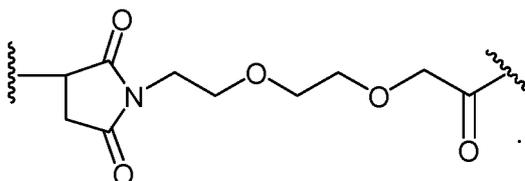
Ha de entenderse a partir de todas las realizaciones ejemplares que incluso cuando no se indica expresamente, pueden ligarse de 1 a 15 restos de fármaco a un Ab (m = 1-15).



Una unidad ensanchadora ilustrativa es la de fórmula (IIIa), en donde R^a es -(CH₂)₅-:

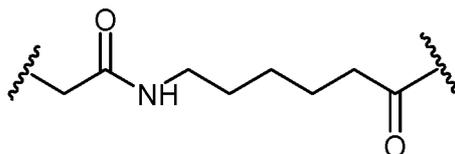


5 Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de fórmula (IIIa), en donde R^a es -(CH₂CH₂O)-CH₂-; y r es 2:

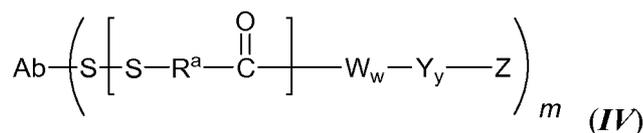


10 Otra unidad ensanchadora ilustrativa es la de fórmula (IIIa), en donde R^a es -arileno- o arilen-alquileo C₁-C₁₀-. En algunas realizaciones, el grupo arilo es un grupo fenilo sin sustituir.

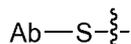
Otra unidad ensanchadora ilustrativa adicional es la de fórmula (IIIb), en donde R^a es -(CH₂)₅-:



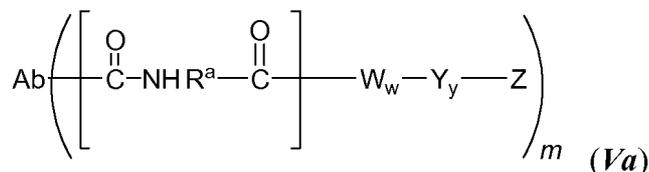
15 En ciertas realizaciones, una unidad ensanchadora está unida a la unidad de Ab a través de un enlace disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad de Ab y un átomo de azufre de la unidad ensanchadora. Una unidad ensanchadora representativa de esta realización se representa entre corchetes en la fórmula (IV), en donde R^a, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son tal como se ha definido anteriormente.

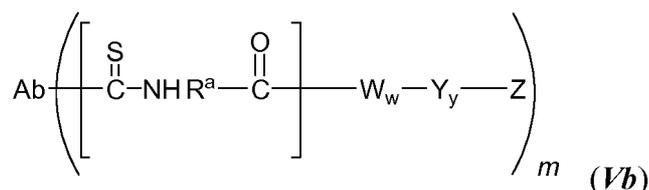


25 Obsérvese que a lo largo de la presente solicitud, el resto S en la fórmula a continuación se refiere a un átomo de azufre de la unidad de Ab, salvo que el contexto indique otra cosa.

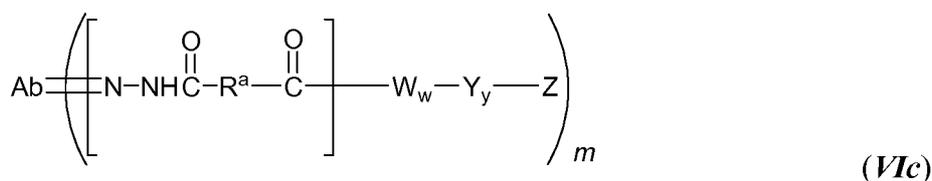
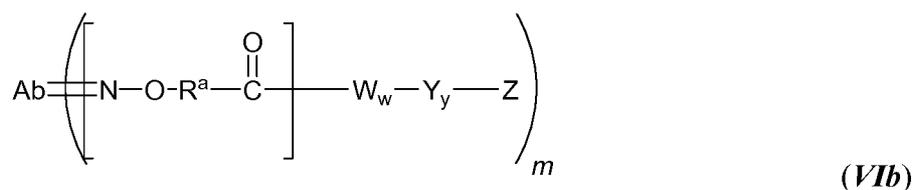
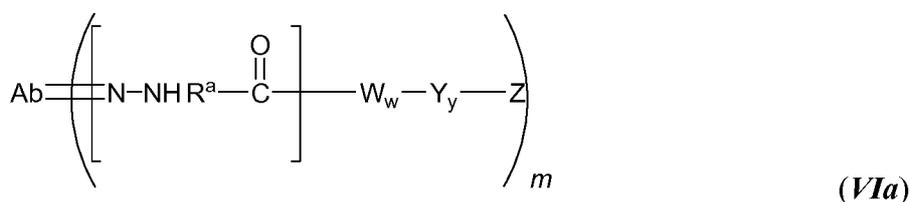


30 En otras realizaciones más, el ensanchador, antes de la unión al Ab, contiene un sitio reactivo que puede formar un enlace con un grupo amino primario o secundario del Ab. Los ejemplos de estos sitios reactivos incluyen, pero sin limitación, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, ésteres de 4-nitrofenilo, ésteres de pentafluorofenilo, ésteres de tetrafluorofenilo, anhídridos, cloruros ácidos, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las fórmulas (Va) y (Vb), en donde -R^a-, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son tal como se ha definido anteriormente;



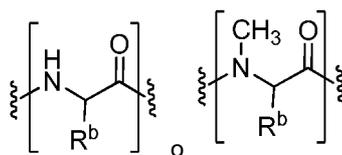


5 En algunas realizaciones, el ensanchador contiene un sitio reactivo que es reactivo con un grupo (-CHO) modificado del carbohidrato que puede estar presente en un Ab. Por ejemplo, un carbohidrato se puede oxidar suavemente utilizando un reactivo como peryodato de sodio y la unidad (-CHO) resultante del carbohidrato oxidado se puede condensar con una unidad ensanchadora de forma que contenga una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina y una arilhidrazida tal como las descritas por Kaneko et al., 1991, Bioconjugate Chem. 2:133-41. Las unidades ensanchadoras representativas de esta realización se representan entre los corchetes de las fórmulas (VIa), (VIb) y (VIc), en donde -R^a-, -Ab-, -W-, -Y-, -Z, w y y son tal como se han definido anteriormente.

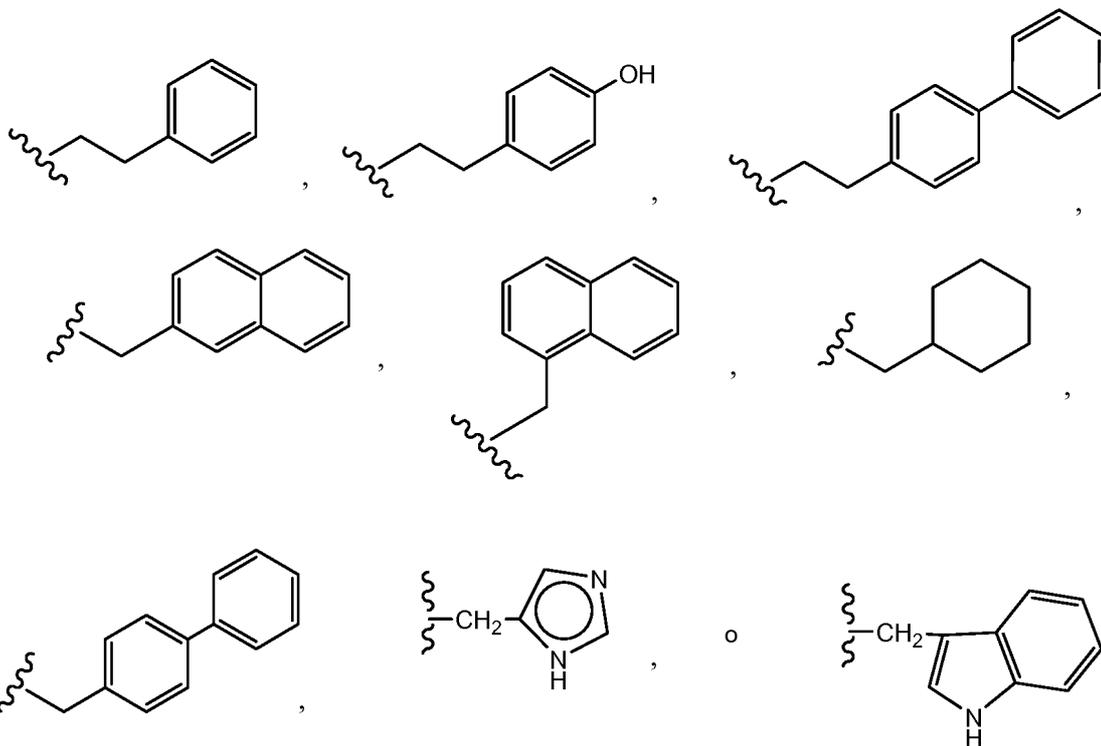


15 La unidad de aminoácido (-W-), cuando está presente, une la unidad ensanchadora a la unidad espaciadora en caso de que esté presente la unidad espaciadora, une la unidad ensanchadora al resto de fármaco si la unidad espaciadora está ausente y une la unidad de Ab al agente terapéutico o al resto marcador si la unidad ensanchadora y la unidad espaciadora están ausentes.

20 W_w- puede ser, por ejemplo, un monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- independientemente tiene la fórmula indicada a continuación entre corchetes y w es un número entero comprendido entre 0 y 12:



30 en donde R^b es hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, sec-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, -CH₂OH, -CH(OH)CH₃, -CH₂CH₂SCH₃, -CH₂CONH₂, -CH₂COOH, -CH₂CH₂CONH₂, -CH₂CH₂COOH, -(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₃NH₂, -(CH₂)₃NHCOCH₃, -(CH₂)₃NHCHO, -(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂, -(CH₂)₄NH₂, -(CH₂)₄NHCOCH₃, -(CH₂)₄NHCHO, -(CH₂)₃NHCONH₂, -(CH₂)₄NHCONH₂, -CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂, 2-piridilmetilo-, 3-piridilmetilo-, 4-piridilmetilo-, fenilo, ciclohexilo,



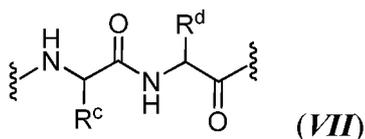
5

10

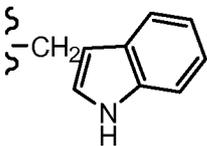
En algunas realizaciones, la unidad de aminoácido puede escindirse enzimáticamente por una o más enzimas, incluyendo una proteasa asociada con el cáncer o con tumores, para liberar el agente terapéutico o marcar el resto (-Z), que en una realización se protona *in vivo* tras su liberación para proporcionar un agente terapéutico o marcador (Z).

15

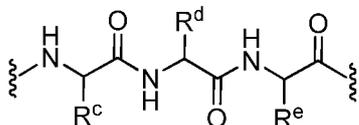
En ciertas realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras realizaciones, la unidad de aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales. Las unidades W_w ilustrativas se representan mediante las fórmulas (VII)-(IX):



en donde R^c y R^d son como se indica a continuación:

R^c	R^d
Bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
metilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_4NH_2$;
isopropilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
bencilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
isobutilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
sec-butilo	$(CH_2)_3NHCONH_2$;
	$(CH_2)_3NHCONH_2$;

bencilo	metilo;
bencilo	(CH ₂) ₃ NHC(=NH)NH ₂ ;

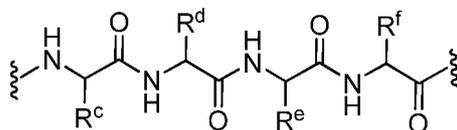


(VIII)

en donde R^c, R^d y R^e son como se indica a continuación:

5

R ^c	R ^d	R ^e
bencilo	Bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;
isopropilo	Bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ; y
H	Bencilo	(CH ₂) ₄ NH ₂ ;



(IX)

en donde R^c, R^d, R^e y R^f son como se indica a continuación:

10

R ^c	R ^d	R ^e	R ^f
H	bencilo	isobutilo	H; y
metilo	isobutilo	metilo	isobutilo.

Las unidades de aminoácido ilustrativas incluyen, pero sin limitación, unidades de fórmula (VI) donde: R^c es bencilo y R^d es -(CH₂)₄NH₂; R^c es isopropilo y R^d es -(CH₂)₄NH₂; o R^c es isopropilo y R^d es -(CH₂)₃NHCONH₂. Otra unidad de aminoácidos ejemplar es una unidad de fórmula (VIII), en donde R^c es bencilo, R^d es bencilo y R^e es -(CH₂)₄NH₂.

15

Pueden diseñarse unidades -W_w- útiles y optimizarse en su selectividad de escisión enzimática por una enzima particular, por ejemplo, una proteasa asociada a tumor. En una realización, una unidad -W_w- es aquella cuya escisión está catalizada por catepsina B, C y D o una proteasa de plasmina.

20

En una realización, -W_w- es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando R^b, R^c, R^d, R^e o R^f es distinto de hidrógeno, el átomo de carbono al que R^b, R^c, R^d, R^e o R^f está unido es quiral.

Cada átomo de carbono al que R^b, R^c, R^d, R^e o R^f se une se encuentra independientemente en la configuración (R) o (S).

25

En un aspecto de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es valina-citrulina (vc o Val-Cit). En otro aspecto, la unidad de aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En otro aspecto más de la unidad de aminoácido, la unidad de aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En otro aspecto más, la unidad de aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homofenilalanina-lisina, tetraisoquinolincarboxilato-lisina, ciclohexilalanina-lisina, ácido isonepecótico-lisina, beta-alanina lisina, glicina-serina-valina-glutamina y ácido isonepecótico.

30

La unidad separadora (-Y-), cuando está presente, enlaza una unidad de aminoácido al agente terapéutico o resto marcador (-Z-) cuando está presente una unidad de aminoácido. Como alternativa, la unidad espaciadora liga la unidad ensanchadora al agente terapéutico cuando la unidad de aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también enlaza el agente terapéutico o resto marcador a la unidad de Ab cuando están ausentes tanto la unidad de aminoácido como la unidad ensanchadora.

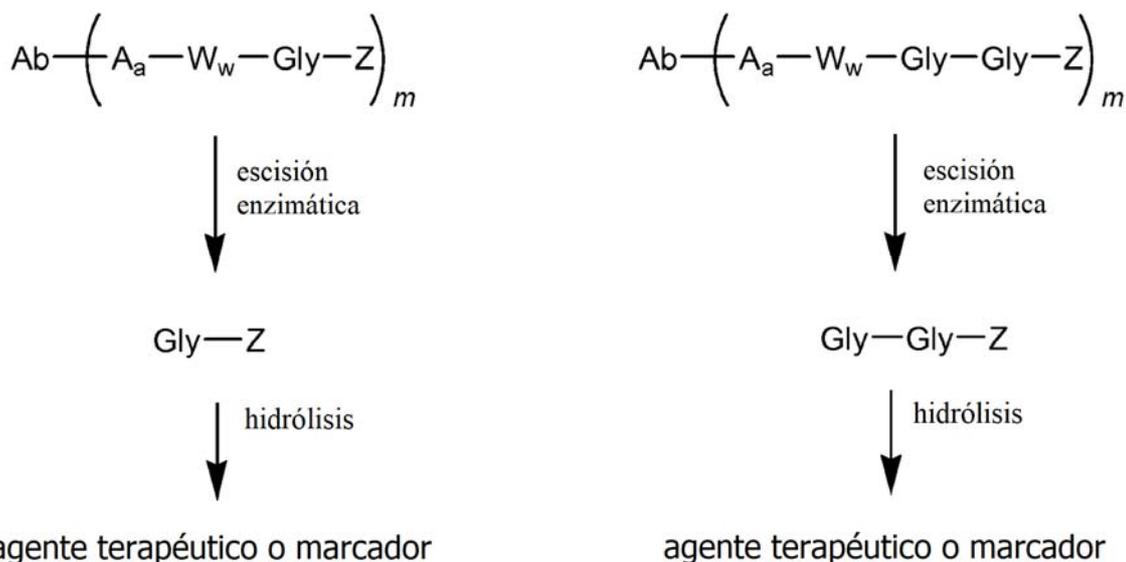
35

Las unidades separadoras son de dos tipos generales: no autoinmolables o autoinmolables. Una unidad espaciadora no autoinmolable es una en la que una parte o la totalidad de la unidad espaciadora permanece unida al agente terapéutico o al resto marcador después de la escisión, especialmente enzimática, de una unidad de aminoácido del

40

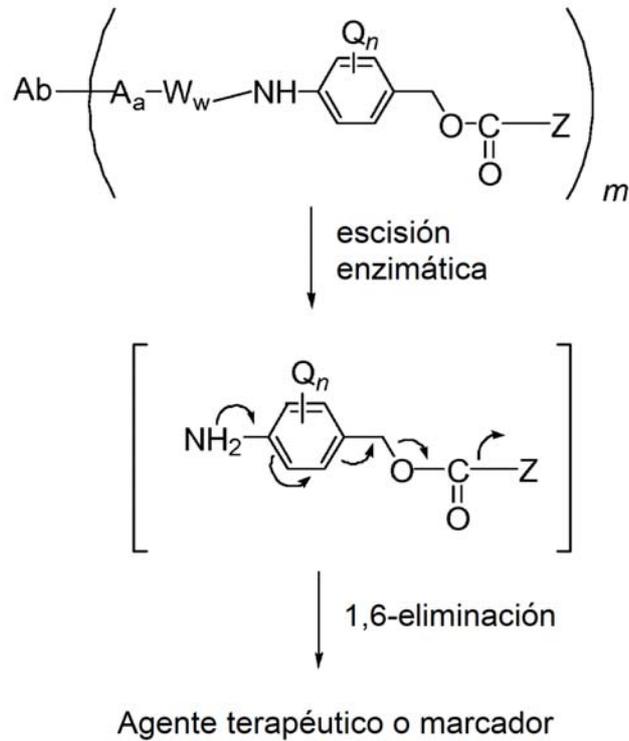
- 5 conjugado de anticuerpo-fármaco. Los ejemplos de una unidad separadora no autoinmolable incluyen, pero sin limitación, una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora de glicina (ambas representadas en el esquema 1) (más adelante). Cuando un conjugado que contiene una unidad espaciadora de glicina-glicina o una unidad espaciadora de glicina sufre escisión enzimática por medio de una enzima (por ejemplo, una proteasa asociada con células tumorales, una proteasa asociada con células cancerosas o una proteasa asociada con linfocitos), se escinde del Ab-Aa-Ww- una glicina-glicina-resto Z o una glicina-resto Z. En una realización, se produce una reacción de hidrólisis independiente en la célula diana, que escinde la glicina-resto Z unida y libera el agente terapéutico o el marcador.

Esquema 1



- 10 En algunas realizaciones, una unidad espaciadora (-Y-) no autoinmolable es -Gly-. En algunas realizaciones, una unidad espaciadora no autoinmolable (-Y-) es -Gly-Gly-.
- 15 En una realización, la invención proporciona un inmunoconjugado de fórmula (II), en donde la unidad espaciadora está ausente ($y = 0$) o es una sal farmacéuticamente aceptable de la misma.
- 20 Como alternativa, un conjugado que contiene una unidad espaciadora autoinmolable puede liberar -Z. Como se usa en el presente documento, la expresión "espaciador autoinmolable" se refiere a un resto químico bifuncional que es capaz de unir juntos covalentemente dos restos químicos espaciados en una molécula tripartita estable. Esta se separará espontáneamente del segundo resto químico si su unión al primer resto se escinde.
- 25 En algunas realizaciones, -Y_n- es una unidad de alcohol *p*-aminobencílico (PAB) (véanse los esquemas 2 y 3) cuya porción de fenileno está sustituida con Q_n, en donde Q es -alquilo C₁-C₈, -alqueno C₂-C₈, -alquino C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alqueno C₂-C₈), -O-(alquino C₂-C₈), halógeno, nitro o ciano; y *n* es un número entero en el intervalo de 0-4. Los grupos alquilo, alqueno y alquino, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.
- 30 En algunas realizaciones, -Y- es un grupo PAB que está ligado a -W_w- a través del átomo de nitrógeno de amino del grupo PAB y se conecta directamente a -Z a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin pretender quedar vinculado a teoría o mecanismo alguno, el esquema 2 representa un posible mecanismo de liberación de un agente terapéutico o marcador (-Z) de un grupo PAB que está unido directamente a -Z por medio de un grupo carbamato o carbonato como se describe por Toki et al., 2002, J. Org. Chem. 67:1866-1872.

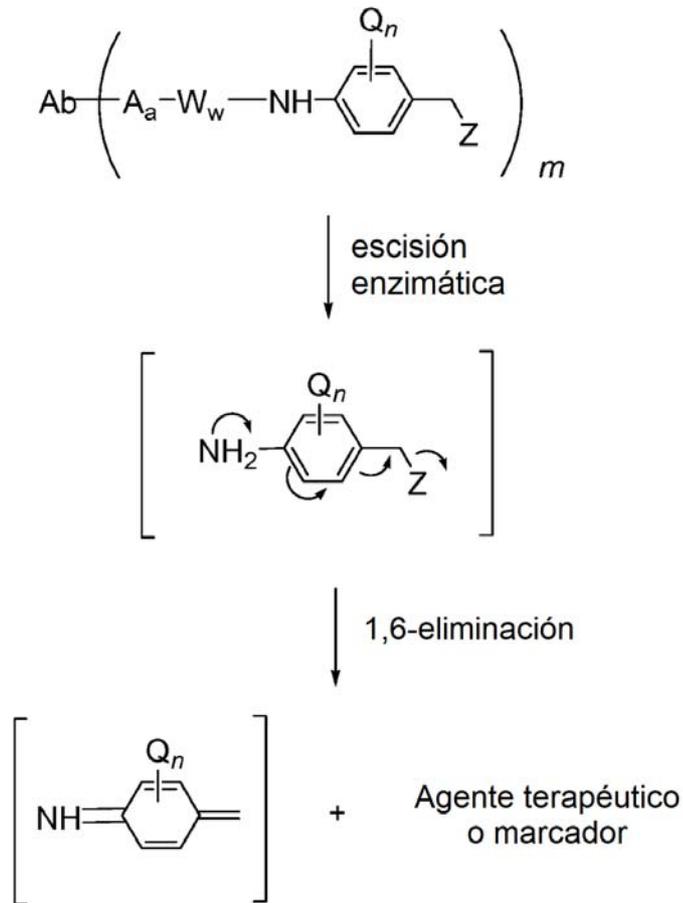
Esquema 2



5 En el esquema 2, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; m es un número entero en el intervalo de 0-4; y *m* varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

10 Sin pretender quedar vinculado a teoría o mecanismo alguno, el esquema 3 representa un posible mecanismo de liberación de un agente terapéutico o resto marcador (-Z) de un grupo PAB que está unido directamente a -Z por medio de un enlace éter o amina, en donde -Z incluye el grupo oxígeno o nitrógeno que forma parte del agente terapéutico o el resto marcador.

Esquema 3

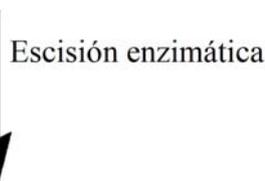
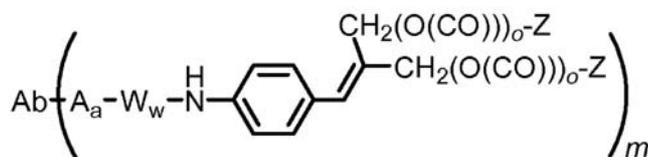


5 En el esquema 3, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; *n* es un número entero en el intervalo de 0-4; y *m* varía de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

10 Otros ejemplos de espaciadores autoinmolables incluyen, pero sin limitación, compuestos aromáticos que son electrónicamente similares al grupo PAB, tales como derivados de 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al., 1999, Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Pueden usarse separadores que experimentan ciclación tras la hidrólisis del enlace amida, tales como amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues et al., 1995, Chemistry Biology 2:223), sistemas de anillo biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] adecuadamente sustituidos (Storm et al., 1972, J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) y amidas del ácido 2-aminofenilpropiónico (Amsberry et al., 1990, J. Org. Chem. 55:5867). La eliminación de fármacos que contienen amina que están sustituidos en la posición α de la glicina (Kingsbury et al., 1984, J. Med. Chem. 27:1447) son también ejemplos de espaciadores autoinmolables.

15 En una realización, la unidad espaciadora es una unidad de bis(hidroximetil)-estireno ramificada (BHMS) como se representa en el esquema 4, que se puede usar para incorporar y liberar múltiples fármacos.

Esquema 4

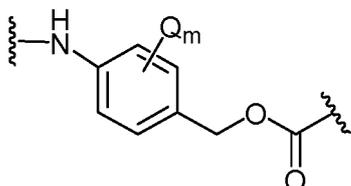


(2 x m) agentes terapéuticos o marcadores

5 En el esquema 4, Q es -alquilo C₁-C₈, -alquenoilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenoilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; n es un número entero en el intervalo de 0-4; o es 0 o 1; y m es un número entero de 1 a aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.

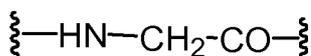
En algunas realizaciones, los restos -Z son iguales. En otra realización más, los restos -Z son diferentes.

10 En un aspecto, las unidades espaciadoras (-Y_y-) están representadas por las fórmulas (X)-(XII):



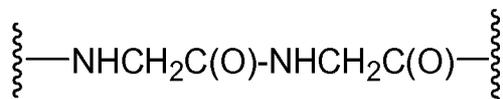
(X)

15 en donde Q es alquilo C₁-C₈, -alquenoilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, -O-(alquilo C₁-C₈), -O-(alquenoilo C₂-C₈), -O-(alquinilo C₂-C₈), -halógeno, -nitro o -ciano; y m es un número entero en el intervalo de 0-4. Los grupos alquilo, alquenoilo y alquinilo, ya estén solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos.



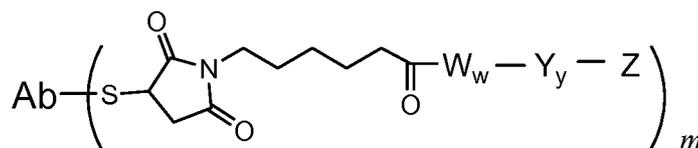
(XI)

20 y

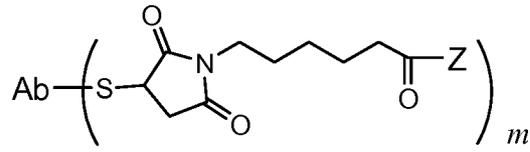


(XII)

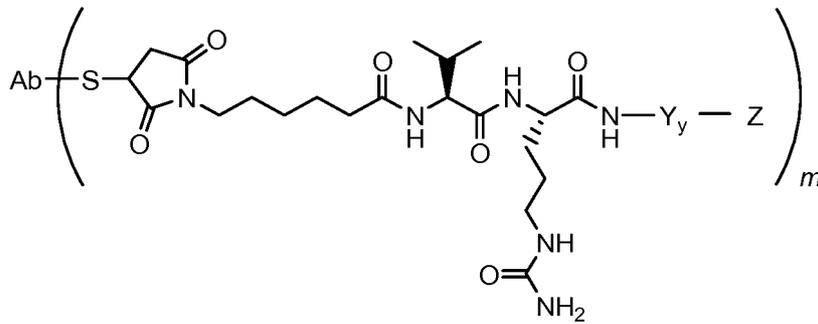
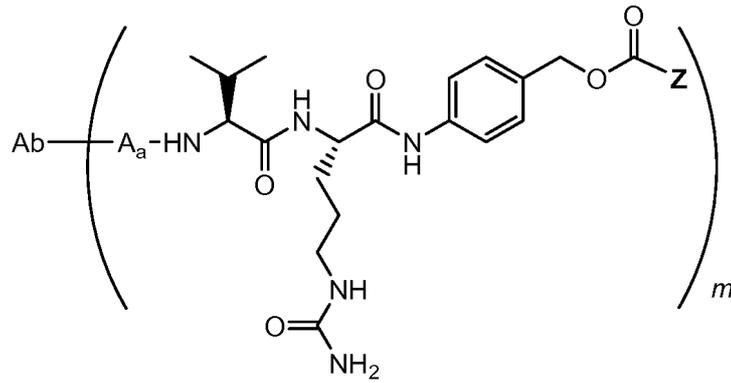
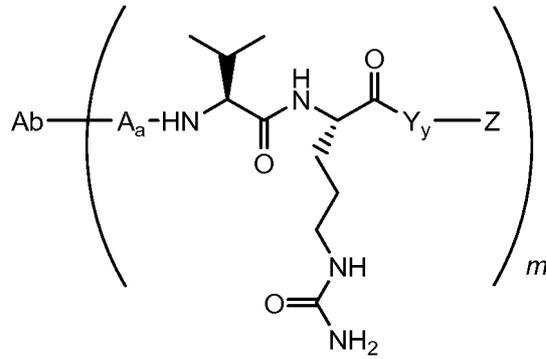
25 En un grupo de realizaciones seleccionadas, los conjugados de fórmula (I) y (II) son:



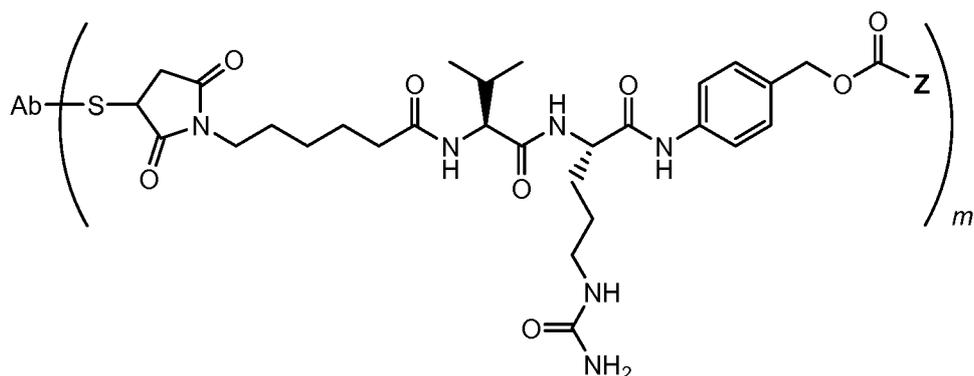
en donde w e y son cada uno 0, 1 o 2:



en donde w e y son cada uno 0;



y



en donde A_a, W_w, Y_y, Z y Ab tienen los significados proporcionados anteriormente.

- 5 La variable Z en la fórmula (I) es un agente o marcador terapéutico. El agente terapéutico puede ser cualquier agente capaz de ejercer un efecto biológico deseado. En algunas realizaciones, el agente terapéutico sensibiliza a la célula para una segunda modalidad terapéutica, por ejemplo, un agente quimioterapéutico, radioterapia, inmunoterapia.

En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un agente citostático o citotóxico. Los ejemplos incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, pentostatina, cladribina, 5-fluorouracilo (5FU), floxuridina (FUDR), arabinósido de citosina (citarabina), metotrexato, trimetoprima, pirimetamina, pemetrexed); agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, uramustina, melfalán, clorambucilo, tiotepa/clorambucilo, ifosfamida, carmustina, lomustina, estreptozocina, busulfán, dibromomanitol, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino, tetranitrato de triplatino, procarbazona, altretamina, dacarbazina, mitozolomida, temozolomida); antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, epirubicina, idarrubicina, valrubicina); antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramicina, estreptozotocina, gramicidina D, mitomicinas (por ejemplo, mitomicina C), duocarmicinas (por ejemplo, CC-1065), calicheamicinas); agentes antimitóticos (incluyendo, por ejemplo, maitansinoides, auristatinas, dolastatinas, criptoficinas, alcaloides de la vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel o un nuevo taxano (véase, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional n.º WO 01/38318, publicada el 31 de mayo de 2001)) y colchicinas; inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, tenipósido, mitoxantrona); e inhibidores del proteasoma (por ejemplo, ácidos peptidil borónicos).

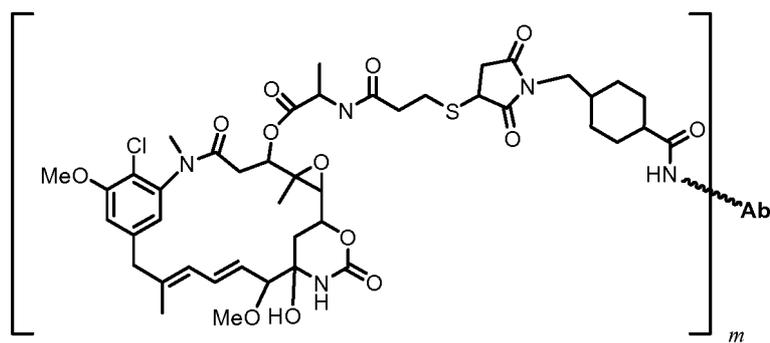
Immunoconjugados con maitansinoides

25 En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un maitansinoide. Los compuestos maitansinoides y los métodos para su conjugación a anticuerpos se describen, por ejemplo, en Chari et al., Cancer Res., 52: 127-131 (1992); Widdison et al., J. Med. Chem. 49: 4392-4408 (2006); y las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.208.020 y 6.333.410. Los ejemplos de maitansinoides incluyen análogos de maitansina que tienen un anillo aromático modificado (por ejemplo, C-19-descloro, C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi) y aquellos que tienen modificaciones en otras posiciones (por ejemplo, C-9-CH, C-14-alcoximetilo, C-14-hidroximetilo o aciloximetilo, C-15-hidroxi/aciloxi, C-15-metoxi, C-18-N-desmetilo, 4,5-desoxi). En ciertas realizaciones, el maitansinoide es N²-desacetil-N²-(4-mercapto-1-oxopentil)maitansina (DM3), N²-desacetil-N²-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina (DM1) o N²-desacetil-N²-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)maitansina (DM4).

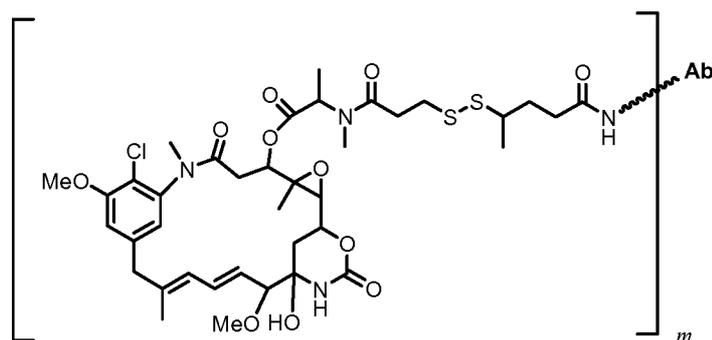
35 Los compuestos maitansinoides que comprenden un grupo sulfhidrilo pueden acoplarse a anticuerpos usando un enlazador heterobifuncional que está conectado al compuesto maitansinoide mediante un enlace tioéter o disulfuro. En algunas realizaciones de este tipo, el enlazador está acoplado a un grupo amino en el anticuerpo (por ejemplo, un grupo amino terminal o el grupo amino épsilon de un resto de lisina). En algunas realizaciones, el enlazador heterobifuncional que se usa para acoplar un compuesto maitansinoide a un anticuerpo es 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (también conocido como 4-(2-piridiltio)pentanoato de N-succinimidilo o SPP), 4-succinimidil-oxycarbonil-2-metil-2-(2-piridiltio)-tolueno (SMPT), 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 3-(2-piridiltio)propionato de N-succinimidilo (SPDP); 4-(2-piridiltio)butirato de N-succinimidilo (SPDB), 2-iminotiolano o anhídrido S-acetilsuccínico.

45 En ciertas realizaciones, el immunoconjugado de fórmula (I) se caracteriza por la fórmula Ab-(SMCC-DM1)_m (fórmula (I-1); Ab-(SPP-DM1)_m (fórmula (I-2); o Ab-(SPDB-DM4)_m (fórmula (I-3), en donde Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC como se describe en el presente documento y m tiene los valores y los valores preferidos descritos anteriormente para la fórmula (I).

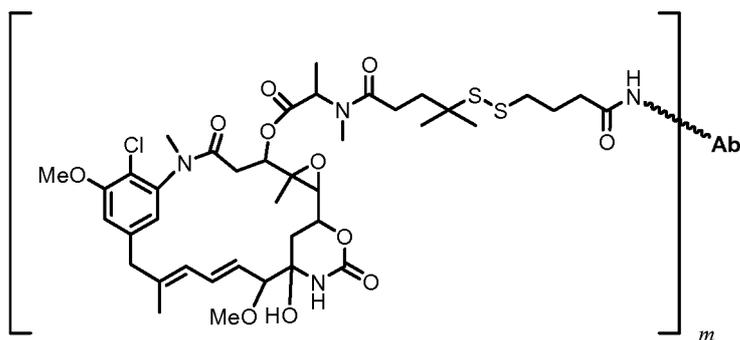
50



(I-1)



(I-2)



(I-3)

5

En algunas realizaciones, la variable Ab en la fórmula (I-1), (I-2) o (I-3) es una molécula de anticuerpo con las características resumidas en las tablas 1 a 6. En ciertas realizaciones, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9.

10

En algunas realizaciones, la variable m en la fórmula (I-1), (I-2) o (I-3) varía de aproximadamente 1 a aproximadamente 10, de aproximadamente 3 a aproximadamente 7 o de aproximadamente 3 a aproximadamente 5.

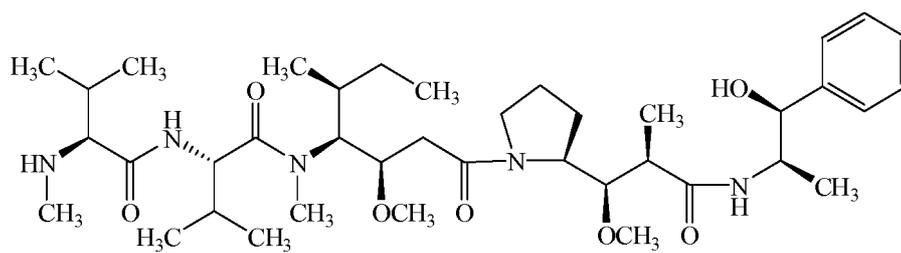
15

En determinadas realizaciones particulares, la invención se refiere a un inmunoc conjugado de fórmula (I-1), (I-2) o (I-3), en donde Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 y m es aproximadamente 4.

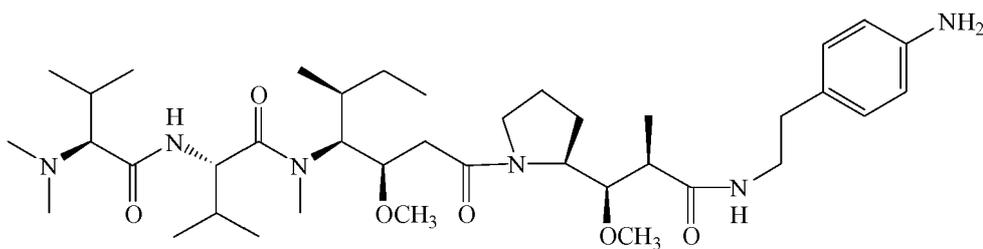
Conjugados con dolastatina y auristatina

20

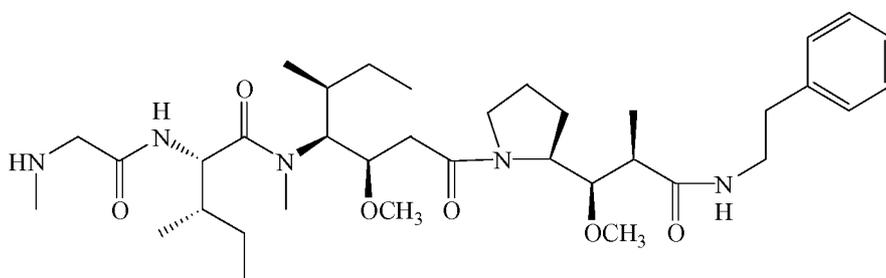
En algunas realizaciones diferentes, el agente terapéutico es una dolastatina. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es una auristatina, tal como auristatina E (también conocida en la técnica como derivado de dolastatina-10) o un derivado de la misma. En algunas realizaciones, el agente terapéutico es un compuesto seleccionado entre los compuestos de las fórmulas (XIII)-(XYIII) o una forma de sal farmacéuticamente aceptable del mismo:



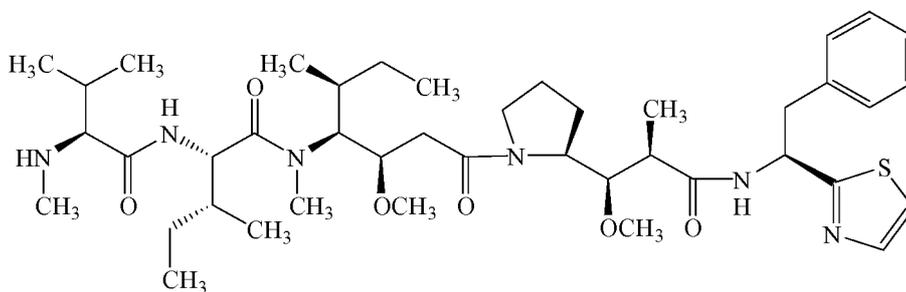
(XIII)



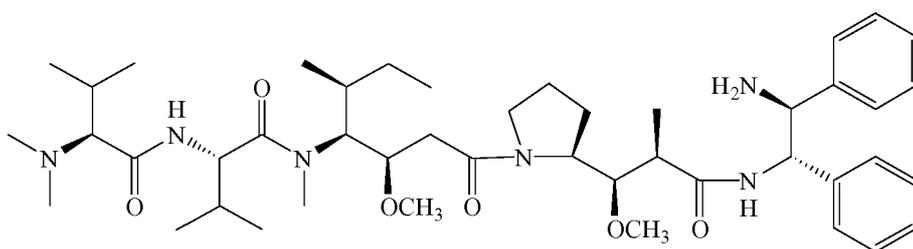
(XIV)



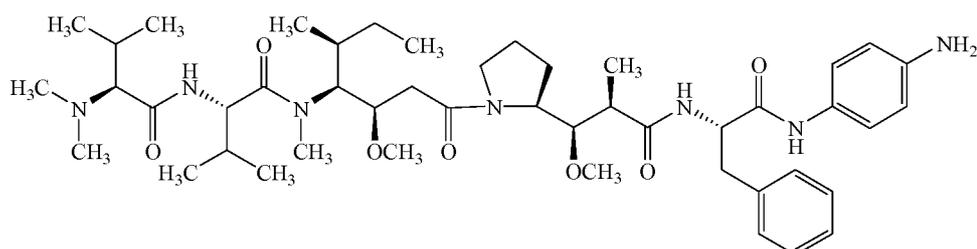
(XV)



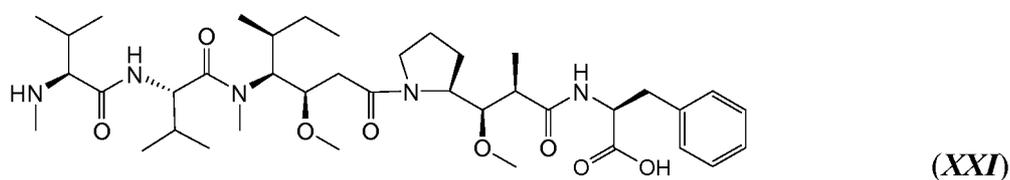
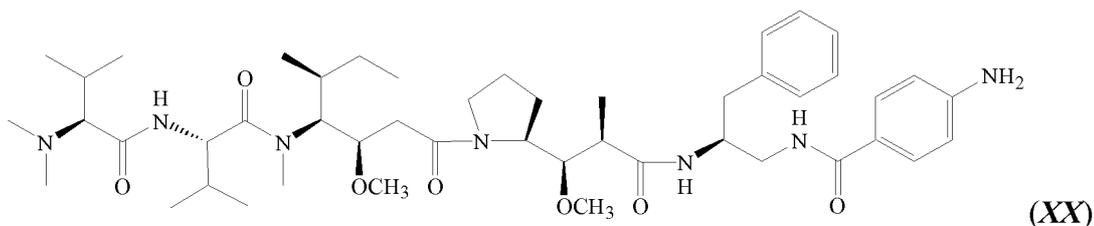
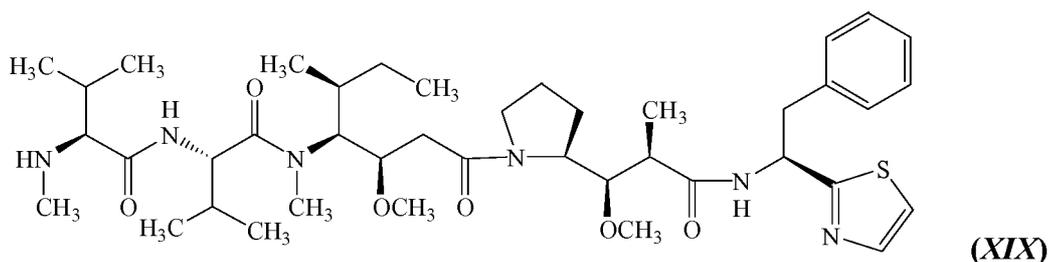
(XVI)



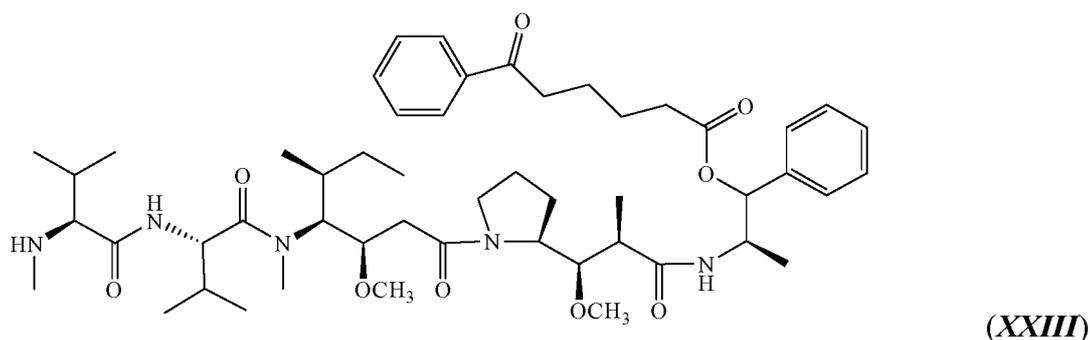
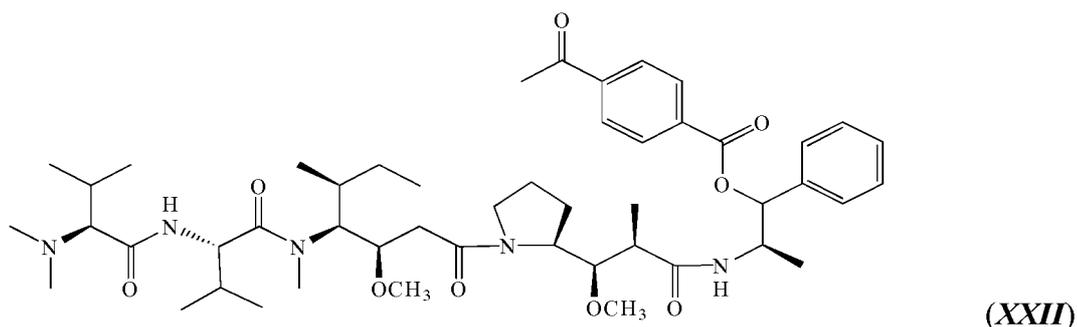
(XVII)



(XVIII)



5



10

Los compuestos de auristatina y los métodos para su conjugación a anticuerpos se describen, por ejemplo, en Doronina et al., *Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003); Hamblett et al, *Clin. Cancer Res.*, 10: 7063-7070 (2004); Carter y Senter, *Cancer J.*, 14 154-169 (2008); las Patentes de los Estados Unidos n.º 7.498.298, 7.091.186, 6.884.869; 6.323.315; 6.239.104; 6.034.065; 5.780.588; 5.665.860; 5.663.149; 5.635.483; 5.599.902; 5.554.725; 5.530.097; 5.521.284; 5.504.191; 5.410.024; 5.138.036; 5.076.973; 4.986.988; 4.978.744; 4.879.278; 4.816.444; y 4.486.414; las Publicaciones de Patente de los Estados Unidos n.º 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649 y 20030083236; y las Publicaciones Internacionales de Patente n.º WO 04/010957 y WO 02/088172.

La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un cetoácido. Por ejemplo, puede hacerse reaccionar auristatina E con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para producir AEB y AEBV, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen auristatina fenilalanina fenilendiamina (AFP; (XVIII)), monometil auristatina E (MMAE; (XIII)) y monometil auristatina F (MMAF; (XXI)).

20

Se ha demostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y tienen actividad antineoplásica. Las auristatinas para su uso en la presente invención se unen a tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático en una línea celular que expresa GCC. Se conocen en la técnica métodos para determinar si un compuesto se une a tubulina. Véase, por ejemplo, Muller et al., Anal. Chem 2006, 78, 4390-4397; Hamel et al., Molecular Pharmacology, 1995 47: 965-976; y Hamel et al., The Journal of Biological Chemistry, 1990 265:28, 17141-17149. A efectos de la presente invención, puede determinarse la afinidad relativa de un compuesto a tubulina. Algunas auristatinas preferidas de la presente invención se unen a tubulina con una afinidad en un intervalo de 10 veces menor (afinidad más débil) que la afinidad de unión de MMAE a tubulina a 10 veces, 20 veces o incluso 100 veces mayor (mayor afinidad) que la afinidad de unión de MMAE a tubulina.

Existen varios ensayos diferentes, conocidos en la técnica, que pueden usarse para determinar si una auristatina o un inmunoconjugado resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico en una línea celular deseada. Por ejemplo, puede medirse la actividad citotóxica o citostática de un inmunoconjugado: exponiendo células de mamífero que expresan una proteína diana del inmunoconjugado en un medio de cultivo celular; cultivando las células durante un periodo de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 5 días; y midiendo la viabilidad celular. Pueden usarse ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), la citotoxicidad y la inducción de la apoptosis (activación de caspasa) del inmunoconjugado.

Para determinar si un inmunoconjugado ejerce un efecto citotóxico, puede usarse un ensayo de incorporación de timidina. Por ejemplo, pueden cultivarse células cancerosas que expresan un antígeno diana a una densidad de 5.000 células/pocillo de una placa de 96 pocillos durante un periodo de 72 horas y exponerse a 0,5 μ Ci de 3 H-timidina durante las 8 horas finales del periodo de 72 horas. La incorporación de 3 H-timidina en células del cultivo se mide en presencia y ausencia del inmunoconjugado.

Para determinar la citotoxicidad, puede medirse la necrosis o la apoptosis (muerte celular programada). La necrosis normalmente va acompañada de permeabilidad aumentada de la membrana plasmática; hinchamiento de la célula y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis normalmente se caracteriza por la formación de ampollas en la membrana, condensación del citoplasma y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de estos efectos en las células cancerosas indica que un inmunoconjugado es útil en el tratamiento de cánceres.

La viabilidad celular puede medirse determinando en una célula la captación de un colorante, tal como rojo neutro, azul de tripano o azul ALAMAR™ (véase, por ejemplo, Page et al., 1993, Intl. J. Oncology 3:473-476). En dicho ensayo, las células se incuban en medio que contiene el colorante, se lavan las células y el resto del colorante, que refleja la captación del colorante, se mide espectrofotométricamente. Puede usarse el colorante de unión a membrana, sulforrodamina B (SRB) para medir la citotoxicidad (Skehan et al., 1990, J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

Como alternativa, se usa una sal de tetrazolio, tal como MTT o WST, en un ensayo colorimétrico cuantitativo para la supervivencia de células de mamífero y la proliferación detectando las células vivas, pero no muertas (véase, por ejemplo, Mosmann, 1983, J. Immunol. Methods 65:55-63).

La apoptosis puede cuantificarse midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se encuentran disponibles métodos fotométricos comerciales para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación de ADN. Los ejemplos de dichos ensayos, incluyendo TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en ADN fragmentado) y los ensayos basados en ELISA, se describen en Biochemica, 1999, n.º 2, págs. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

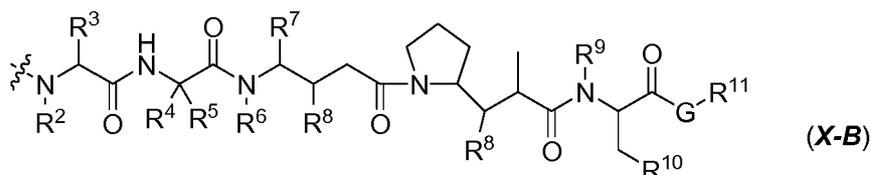
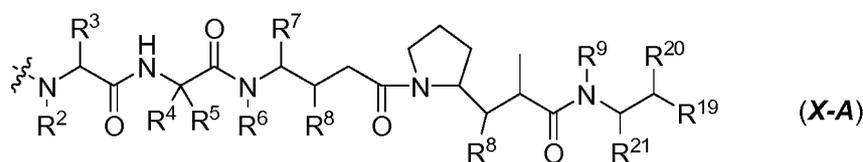
También puede determinarse la apoptosis midiendo los cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, como en el caso de la necrosis, puede determinarse la pérdida de integridad de la membrana plasmática midiendo la captación de ciertos colorantes (por ejemplo, un colorante fluorescente, tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Se ha descrito un método para medir el número de células apoptóticas por Duke y Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al. eds., 1992, págs. 3.17.1-3.17.16). Las células también pueden marcarse con un colorante de ADN (por ejemplo, naranja de acridina, bromuro de etidio o yoduro de propidio) y las células se observan para detectar condensación y marginación de la cromatina a lo largo de la membrana nuclear interna. Otros cambios morfológicos que pueden medirse para determinar la apoptosis incluyen, por ejemplo, condensación citoplasmática, formación de ampollas de membrana aumentada y encogimiento celular.

La presencia de células apoptóticas puede medirse en los compartimentos tanto adheridos como "flotantes" de los cultivos. Por ejemplo, pueden recogerse ambos compartimentos retirando el sobrenadante, tripsinizando las células acopladas, combinando las preparaciones después de una etapa de lavado por centrifugación (por ejemplo, 10 minutos a 2000 rpm) y determinando la apoptosis (por ejemplo, midiendo la fragmentación del ADN). (Véase, por ejemplo, Piazza et al., 1995, Cancer Research 55:3110-16).

Pueden evaluarse o validarse los efectos de los inmunoconjugados en modelos animales. Los expertos en la materia conocen una serie de modelos de cánceres en animales establecidos, cualquiera de los cuales puede usarse para evaluar la eficacia de un inmunoconjugado. Se describen ejemplos no limitantes de dichos modelos más adelante. Además, pueden crearse modelos en animales pequeños para determinar las eficacias *in vivo* de los

inmunoconjugados implantando líneas celulares tumorales humanas en estirpes de roedor inmunodeficientes adecuadas, por ejemplo, ratones atímicos desnudos o ratones SCID.

En algunas realizaciones, la variable -Z en la fórmula (I) es un resto de auristatina de la fórmula (X-A) o la fórmula (X-B):



10 en donde, independientemente en cada localización:

la línea ondulada indica un enlace;

R² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

R³ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, -alquilen C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinilen C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquilen C₁-C₂₀(arilo), -alquenilen C₂-C₂₀(arilo), -alquinilen C₂-C₂₀(arilo), -heterociclo, -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinilen C₂-C₂₀(heterociclo);

R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, carbociclo, -alquilen C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinilen C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquilen C₁-C₂₀(arilo), -alquenilen C₂-C₂₀(arilo), -alquinilen C₂-C₂₀(arilo), -heterociclo, -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinilen C₂-C₂₀(heterociclo);

R⁵ es -H o -alquilo C₁-C₈;

o R⁴ y R⁵ de manera conjunta forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -(CR^aR^b)_s, en donde R^a y R^b son independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o -carbociclo y s es 2, 3, 4, 5 o 6,

R⁶ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

R⁷ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -alquilen C₁-C₂₀(carbociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(carbociclo), -alquinilen C₂-C₂₀(carbociclo), -arilo, -alquilen C₁-C₂₀(arilo), -alquenilen C₂-C₂₀(arilo), -alquinilen C₂-C₂₀(arilo), heterociclo, -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -alquenilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinilen C₂-C₂₀(heterociclo);

cada R⁸ es independientemente -H, -OH, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), -O-(alquinilo C₁-C₂₀) o -carbociclo;

R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

R¹⁹ es -arilo, -heterociclo o -carbociclo;

R²⁰ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -carbociclo, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀), -O-(alquinilo C₂-C₂₀) u OR¹⁸, en donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo o un enlace directo, donde OR¹⁸ representa =O;

R²¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo o -carbociclo;

R¹⁰ es -arilo o -heterociclo;

G es -O-, -S-, -NH- o -NR¹²-, en donde R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀;

R¹¹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo, -heterociclo, -(R¹³O)_s-R¹⁴ o -(R¹³O)_s-CH(R¹⁵)₂; s es un número entero en el intervalo de 0-1000;

R¹³ es -alquilenilo C₂-C₂₀, -alquenilenilo C₂-C₂₀ o -alquinilenilo C₂-C₂₀;

R¹⁴ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀;

cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H, -COOH, -(CH₂)_t-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_t-SO₃H, -(CH₂)_t-SO₃-alquilo C₁-C₂₀, -(CH₂)_t-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_t-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀;

cada aparición de R¹⁶ es independientemente -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_t-COOH; y

t es un número entero en el intervalo de 0 a 6; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, arilo, carbociclo y heterociclo, ya estén solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

Las auristatinas de fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, arilo, carbociclo y heterociclo están sin sustituir.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde los grupos de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ están sin

sustituir y los grupos de R¹⁹, R²⁰ y R²¹ están opcionalmente sustituidas como se describe en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde

- 5 R² es -alquilo C₁-C₈;
 R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀,
 carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -alquilen C₁-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenilen C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆
 monocíclico), -alquinilen C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -arilo C₆-C₁₀, -alquilen C₁-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -
 10 alquenilen C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -alquinilen C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -heterociclo, -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -
 alquenilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinilen C₂-C₂₀(heterociclo); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo,
 alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, carbociclo y heterociclo están opcionalmente sustituidos;
 R⁵ es -hidrógeno;
 R⁶ es -alquilo C₁-C₈;
 cada R⁸ se selecciona independientemente entre -OH, -O-(alquilo C₁-C₂₀), -O-(alquenilo C₂-C₂₀) u -O-(alquinilo C₂-
 15 C₂₀) en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;
 R⁹ es -hidrógeno o -alquilo C₁-C₈;
 R¹⁹ es fenilo opcionalmente sustituido;
 R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo o un enlace directo, donde OR¹⁸ representa =O;
 R²¹ se selecciona entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀ o -carbociclo; en donde dichos
 20 radicales alquilo, alquenilo, alquinilo y carbociclo están opcionalmente sustituidos; o una sal farmacéuticamente
 aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde

- 25 R² es metilo;
 R³ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈ o -alquinilo C₂-C₈, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo
 están opcionalmente sustituidos;
 R⁴ es -H, -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈, -alquinilo C₂-C₈, carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -arilo C₆-C₁₀, -alquilen C₁-
 30 C₈(arilo C₆-C₁₀), -alquenilen C₂-C₈(arilo C₆-C₁₀), -alquinilen C₂-C₈(arilo C₆-C₁₀), -alquilen C₁-C₈ (carbociclo C₃-C₆
 monocíclico), -alquenilen C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquinilen C₂-C₈ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico);
 en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, arilo y carbociclo, ya
 estén solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos;
 R⁵ es H; R⁶ es metilo;
 R⁷ es -alquilo C₁-C₈, -alquenilo C₂-C₈ o -alquinilo C₂-C₈;
 35 cada R⁸ es metoxi;
 R⁹ es -hidrógeno o -alquilo C₁-C₈;
 R¹⁹ es fenilo;
 R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es -H, un grupo protector de hidroxilo o un enlace directo, donde OR¹⁸ representa =O;
 R²¹ es metilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde

- 40 R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es
 metoxi; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁹ es fenilo; R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo protector de hidroxilo
 o un enlace directo, donde OR¹⁸ representa =O; y R²¹ es metilo; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) incluyen aquellas en donde

- 45 R² es metilo o alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo
 C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁹ es fenilo; R²⁰ es OR¹⁸; en donde R¹⁸ es H, un grupo
 50 protector de hidroxilo o un enlace directo, donde OR¹⁸ representa =O; y R²¹ es alquilo C₁-C₃; o una sal
 farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde

- 55 R² es metilo;
 R³, R⁴ y R⁷ se seleccionan independientemente entre -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀,
 carbociclo C₃-C₆ monocíclico, -alquilen C₁-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -alquenilen C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆
 monocíclico), -alquinilen C₂-C₂₀ (carbociclo C₃-C₆ monocíclico), -arilo C₆-C₁₀, -alquilen C₁-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -
 60 alquenilen C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -alquinilen C₂-C₂₀ (arilo C₆-C₁₀), -heterociclo, -alquilen C₁-C₂₀(heterociclo), -
 alquenilen C₂-C₂₀(heterociclo) o -alquinilen C₂-C₂₀(heterociclo); en donde dichos radicales alquilo, alquenilo,
 alquinilo, alquilen, alquenileno, alquinileno, carbociclo, arilo y heterocíclicos, ya estén solos o como parte de otro
 grupo, están opcionalmente sustituidos;
 R⁵ es -H;
 R⁶ es metilo; cada R⁸ es metoxi;
 R⁹ es -H, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀; en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y
 65 alquinilo están opcionalmente sustituidos;
 R¹⁰ es arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido;

G es -O-, -S-, -NH- o -NR¹²-, en donde R¹² es -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R¹¹ es -H-, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀, -alquinilo C₂-C₂₀, -arilo-, -heterociclo-, -(R¹³O)_s-R¹⁴ o -(R¹³O)_s-CH(R¹⁵)₂, en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo y heterociclo están opcionalmente sustituidos; s es un número entero en el intervalo de 0-1000;

R¹³ es -alquilenilo C₂-C₂₀, -alquenilenilo C₂-C₂₀ o -alquinilenilo C₂-C₂₀, cada uno de los cuales está opcionalmente sustituido;

R¹⁴ es -H-, -alquilo C₁-C₂₀, -alquenilo C₂-C₂₀ o -alquinilo C₂-C₂₀ en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

cada aparición de R¹⁵ es independientemente -H-, -COOH-, -(CH₂)_t-N(R¹⁶)₂-, -(CH₂)_r-SO₃H-, -(CH₂)_y-SO₃-alquilo C₁-C₂₀-, -(CH₂)_r-SO₃-alquenilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_r-SO₃-alquinilo C₂-C₂₀ en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

cada aparición de R¹⁶ es independientemente -H-, -alquilo C₁-C₂₀-, -alquenilo C₂-C₂₀-, -alquinilo C₂-C₂₀ o -(CH₂)_r-COOH en donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos; t es un número entero en el intervalo de 0 a 6; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunas de estas realizaciones, R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido;

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde los grupos de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ y R⁹ están sin sustituir y los grupos de R¹⁰ y R¹¹ son como se describen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquilenilo, alquenilenilo, alquinilenilo, arilo, carbociclo y heterociclo están sin sustituir.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde

R² es alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido; G es O, S o NH; y R¹¹ es como se define en el presente documento; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde

R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi;

R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ es fenilo opcionalmente sustituido; G es O, S o NH; y R¹¹ es como se define en el presente documento; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde

R² es metilo; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es metilo; R⁷ es isopropilo o sec-butilo; R⁸ es metoxi;

R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈; R¹⁰ es fenilo; y G es O o NH y R¹¹ es como se define en el presente documento, preferentemente hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde

R² es alquilo C₁-C₃; R³ es H o alquilo C₁-C₃; R⁴ es alquilo C₁-C₅; R⁵ es H; R⁶ es alquilo C₁-C₃; R⁷ es alquilo C₁-C₅; R⁸ es alcoxi C₁-C₃; R⁹ es hidrógeno o alquilo C₁-C₈;

R¹⁰ es fenilo; y G es O o NH y R¹¹ es como se define en el presente documento, preferentemente hidrógeno; o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) o (X-B) incluyen aquellas en donde R³, R⁴ y R⁷ son, independientemente, isopropilo o sec-butilo y R⁵ es H. En una realización ejemplar, R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R⁵ es H y R⁷ es sec-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) o (X-B) incluyen aquellas en donde R² y R⁶ son cada uno metilo y R⁹ es H. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) o (X-B) incluyen aquellas en donde cada aparición de R⁸ es -OCH₃. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-A) o (X-B) incluyen aquellas en donde R³ y R⁴ son cada uno isopropilo, R² y R⁶ son cada uno metilo, R⁵ es H, R⁷ es sec-butilo, cada aparición de R⁸ es -OCH₃ y R⁹ es H. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde G es -O- o -NH-. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde R¹⁰ es arilo. El resto de los sustituyentes son como se

definen en el presente documento.

Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas donde R¹⁰ es -fenilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

5 Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde G es -O- y R¹¹ es H, metilo o t-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

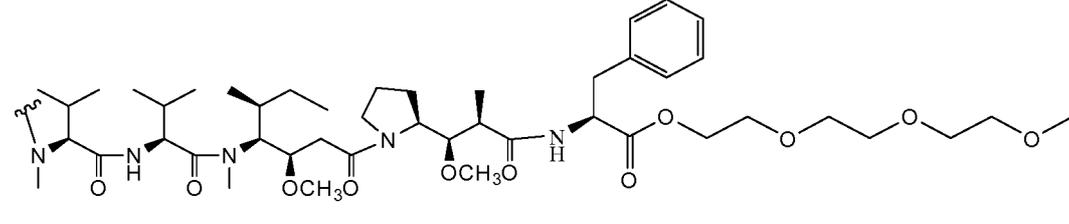
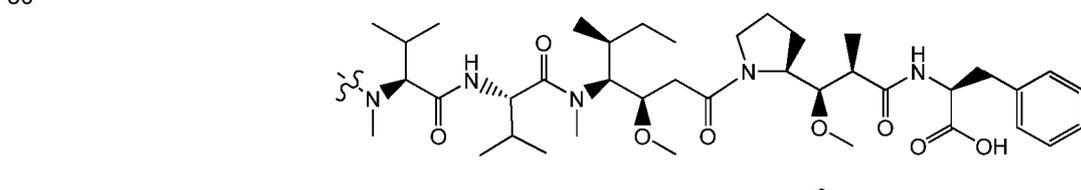
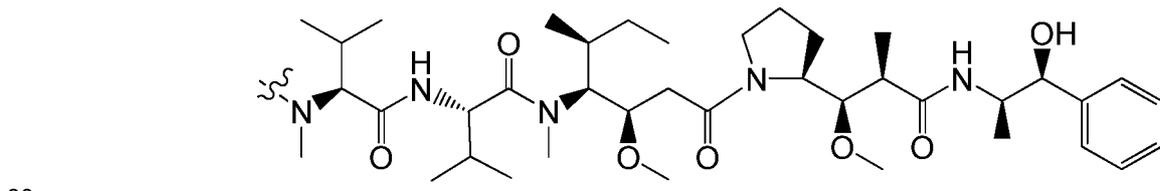
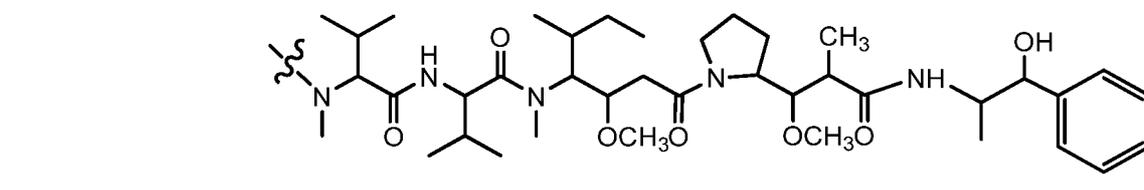
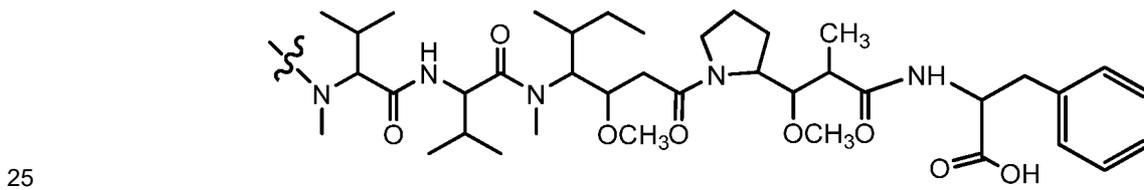
10 Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde, cuando G es -NH, R¹¹ es -(R¹³O)_s-CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es -(CH₂)_t-N(R¹⁶)₂ y R¹⁶ es -alquilo C₁-C₈ o -(CH₂)_r-COOH. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

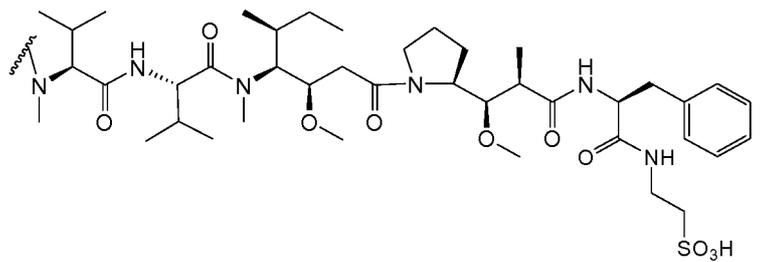
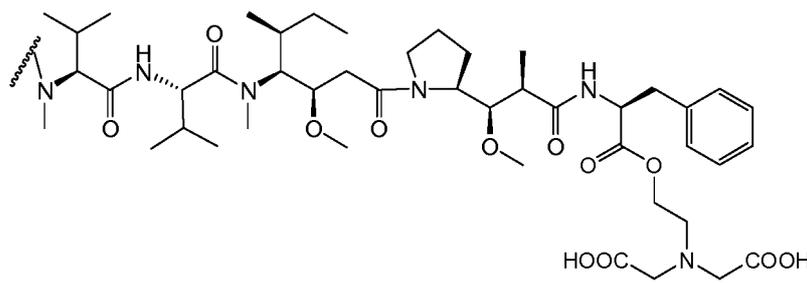
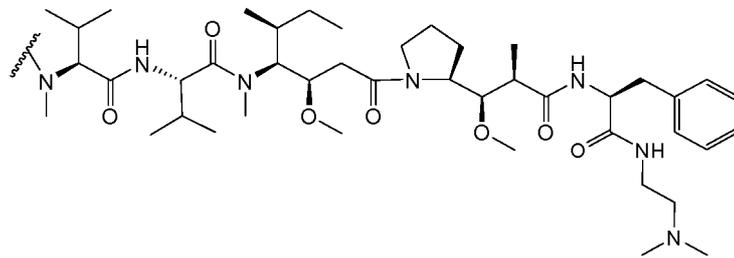
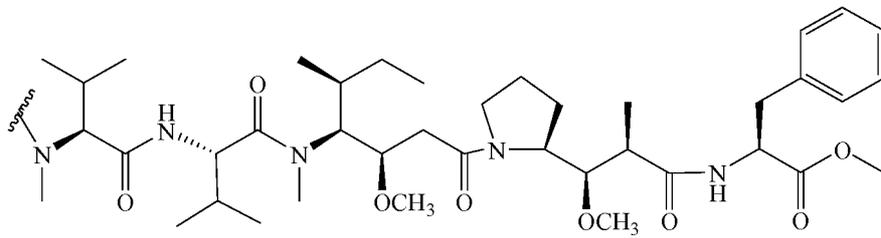
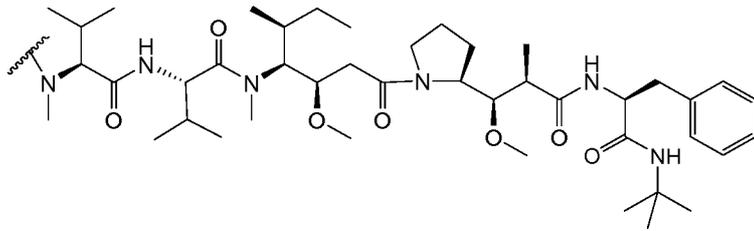
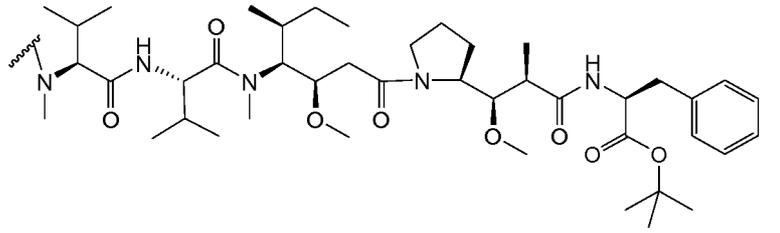
15 Las auristatinas de la fórmula (X-B) incluyen aquellas en donde cuando G es -NH, R¹¹ es -(R¹³O)_s-CH(R¹⁵)₂, en donde R¹⁵ es H o -(CH₂)_r-SO₃H. El resto de los sustituyentes son como se definen en el presente documento.

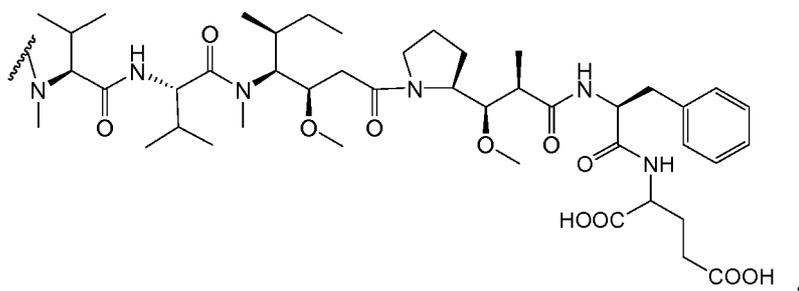
En realizaciones preferidas de los inmunoconjugados de fórmula (II), cuando Z es una molécula de auristatina de fórmula (X-A), w es un número entero en el intervalo de 1 a 12, preferentemente de 2 a 12, y es 1 o 2 y a es preferentemente 1.

20 En algunas realizaciones de los inmunoconjugados de fórmula (II), cuando Z es una molécula de auristatina de fórmula (X-B), a es 1 y w e y son 0.

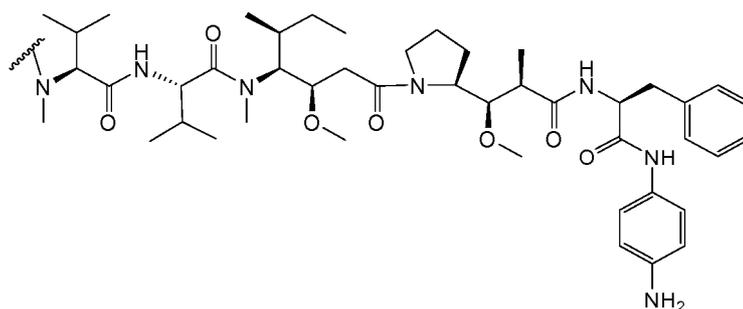
Los agentes terapéuticos ilustrativos (-Z) incluyen aquellos que tienen las siguientes estructuras:







y



5

En un aspecto, los grupos hidrófilos, tales como, pero sin limitación, ésteres de trietilenglicol (TEG) puede unirse a la molécula de auristatina de fórmula (X-B) en R¹¹. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, los grupos hidrófilos ayudan a la internalización y la no aglomeración del agente terapéutico.

10

En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es TZT-1027. En algunas realizaciones, el agente terapéutico no es auristatina E, dolastatina 10 o auristatina PE.

15

En algunas realizaciones, la molécula de auristatina está unida a un resto de cisteína en la molécula de anticuerpo por medio de un enlazador que contiene un resto de maleimida, por ejemplo, un resto de maleimidocaproilo.

20

En algunas realizaciones, la molécula de auristatina está acoplada a la molécula de anticuerpo usando un enlazador heterobifuncional que está conectado a un grupo hidroxilo en la molécula de auristatina. En algunas realizaciones de este tipo, el enlazador comprende una hidrazona. En algunas realizaciones, el enlazador es un compuesto de hidrazona formado mediante la reacción de maleimidocaproilhidrazida y un ácido cetocarboxílico, por ejemplo, ácido 5-benzoilvalérico. En realizaciones particulares, el enlazador es ácido (Z)-6-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)-hexanoil)hidrazono)-6-fenilhexanoico.

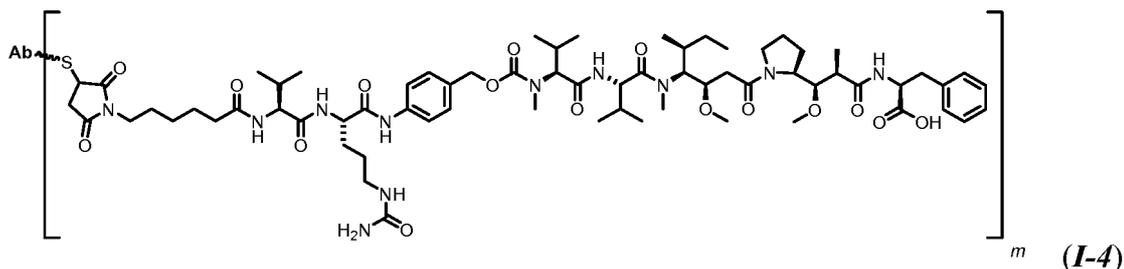
25

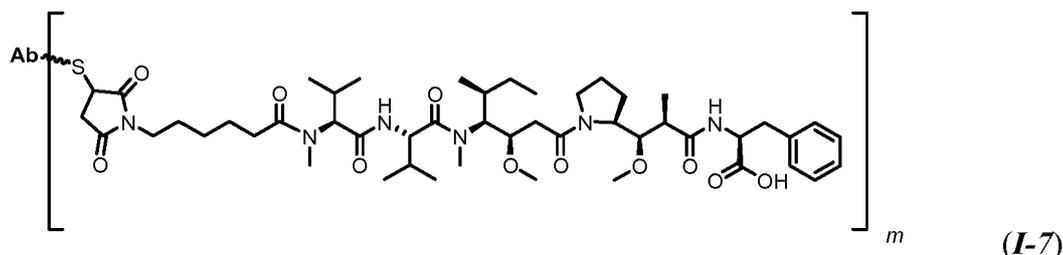
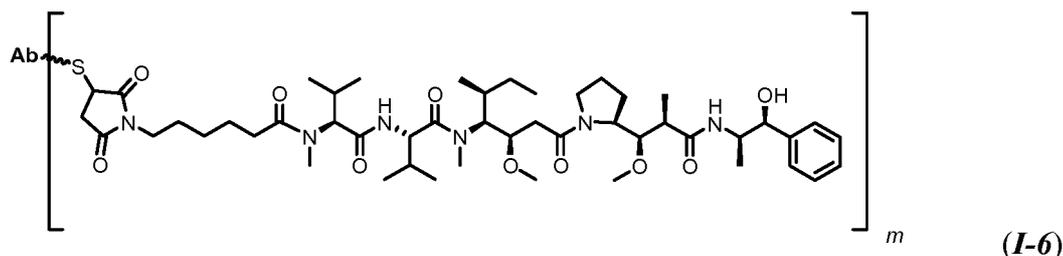
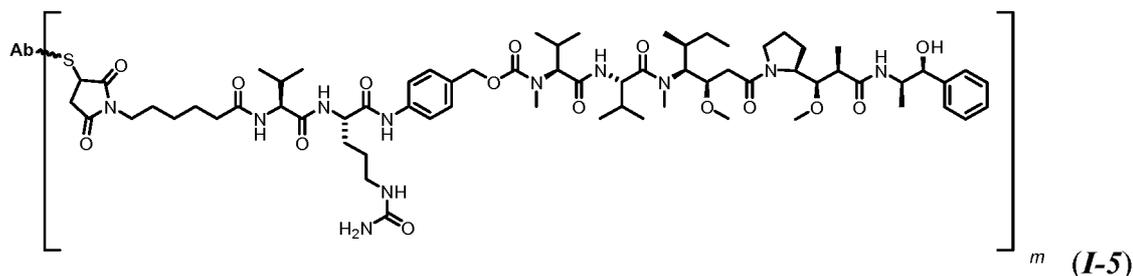
En algunas realizaciones diferentes, la molécula de auristatina se acopla al anticuerpo usando un enlazador heterobifuncional que está conectado a un grupo monometilamino en la molécula de auristatina. En algunas realizaciones, el enlazador comprende un resto escindible, por ejemplo, un resto peptídico y un espaciador de *p*-aminobencilcarbamato autoinmolable. Los enlazadores ejemplares incluyen maleimidocaproilo (mc), maleimidocaproil-L-fenilalanina-L-lisina-*p*-aminobencilcarbamato y maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato (vc).

30

En ciertas realizaciones, el inmunocombinado de fórmula (I) se caracteriza por la fórmula Ab-(vc-MMAF)_m (fórmula (I-4)); Ab-(vc-MMAE)_m (fórmula (I-5)); Ab-(mc-MMAE)_m (fórmula (I-6)); o Ab-(mc-MMAF)_m, (fórmula (I-7)), en donde Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC como se describe en el presente documento, S es un átomo de azufre del anticuerpo y *m* tiene los valores y los valores preferidos descritos anteriormente para la fórmula (I). En ciertas realizaciones, *m* es un número entero de 1 a aproximadamente 5.

35





5

10

15

20

25

30

35

40

En algunas realizaciones, la variable Ab en la fórmula (I-4), (I-5), (I-6) o (I-7) es una molécula de anticuerpo con características resumidas en las tablas 1 a 6. En ciertas realizaciones, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9.

En algunas realizaciones, la variable m en la fórmula (I-4), (I-5), (I-6) o (I-7) varía de aproximadamente 2 a aproximadamente 10, de aproximadamente 6 a aproximadamente 8 o de aproximadamente 4 a aproximadamente 6.

En determinadas realizaciones particulares, la invención se refiere a un inmunocombinado de fórmula (I-4), (I-5), (I-6) o (I-7), en donde Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 y m es aproximadamente 4.

Los inmunocombinados divulgados en el presente documento pueden usarse para modificar una respuesta biológica dada. No ha de interpretarse que el agente terapéutico está limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el agente terapéutico puede ser un ácido nucleico, una proteína o un polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Por ejemplo, la molécula de anticuerpo puede conjugarse a una molécula antisentido, una molécula de ARNpi, una molécula de ARNhc o una molécula de miARN que puede interferir con la expresión de un gen, produciendo de este modo un efecto biológico deseado.

Las proteínas y polipéptidos que pueden conjugarse a las moléculas de anticuerpo de la invención incluyen, por ejemplo, toxinas y componentes de las mismas, tales como abrina, la cadena A de abrina, ricina, la cadena A de ricina, modeccina, la cadena A de modeccina, alfasarcina, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), PE38 (exotoxina truncada de *Pseudomonas*), gelonina, toxina diftérica, fragmento A de toxina diftérica, ciertas proteínas de *Aleurites fordii*, ciertas proteínas de *Dianthus caryophyllus* (por ejemplo, diantina 30 y diantina 32), ciertas proteínas de *Phytolacca Americana* (por ejemplo, PAP, PAPII y PAP-S), ciertas proteínas de *Saponaria officinalis* (por ejemplo, saporina 6), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, mitogilina, restrictocina, fenomicina y enomicina; proteínas para acoplar el sistema inmunitario al tumor o inducir una función efectora en el tumor, tales como factor de necrosis tumoral, interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas y activador de plasminógeno tisular; y modificadores de la respuesta biológica, tales como, por ejemplo, citocinas y linfocinas (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF") y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF")) y otros factores de crecimiento.

Los anticuerpos de la invención también pueden conjugarse o fusionarse a proteínas de la superficie vírica presentes en partículas víricas. Por ejemplo, puede fusionarse un anticuerpo anti-GCC monocatenario de la presente invención

- (por ejemplo, para formar una proteína de fusión) a una proteína de la superficie vírica. Como alternativa, un anticuerpo anti-GCC entero de la presente invención o un fragmento del mismo, puede conjugarse químicamente (por ejemplo, mediante un enlazador químico) a una proteína de la superficie vírica. Preferentemente, el virus es uno que se fusiona con membranas endocíticas, por ejemplo, un virus de la gripe, de tal forma que el virus se internaliza junto con el anticuerpo anti-GCC y de este modo, infecta a las células que expresan GCC. El virus puede modificarse por ingeniería genética como una toxina celular. Por ejemplo, el virus podría expresar o inducir la expresión de genes que son tóxicos para células, por ejemplo, genes promotores de la muerte celular. Preferentemente, dichos virus pueden ser incapaces de replicación vírica.
- Puede conjugarse una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento a un profármaco o activador de profármaco. En un método para eliminar o suprimir células tumorales, se conjuga una primera molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención con un profármaco que se activa únicamente cuando se encuentra en estrecha proximidad con un activador de profármaco. El activador de profármaco se conjuga con una segunda molécula de anticuerpo, preferentemente una que se une a un sitio sin competición en la molécula de GCC. Puede determinarse si dos anticuerpos se unen a sitios de unión competitivos o no competitivos mediante ensayos de unión competitivos. Dichos pares de profármaco adecuados para su uso en la práctica de la presente invención se describen en Blakely et al., "ZD2767, an Improved System for Antibody-directed Enzyme Prodrug Therapy That Results in Tumor Regressions in Colorectal Tumor Xenografts", (1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292.
- También pueden acoplarse radioisótopos terapéuticamente activos a anticuerpos anti-GCC o a fragmentos de unión a antígeno o derivados de los mismos. Pueden usarse isótopos radiactivos en aplicaciones de diagnóstico o terapéuticas. Los isótopos radiactivos que pueden acoplarse a los anticuerpos anti-GCC incluyen, pero sin limitación, emisores α , β o γ o emisores β y γ . Véase, por ejemplo, S.E. Order, "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W. Baldwin et al. (eds.), págs. 303-316 (Academic Press 1985). Dichos isótopos radiactivos incluyen, pero sin limitación, cobre (^{64}Cu), yodo (^{131}I o ^{125}I), itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio, astato (^{211}At), renio (^{186}Re), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), indio (^{111}In), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), fósforo (^{32}P), rodio (^{188}Rh), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^3H), cromo (^{51}Cr), cloro (^{36}Cl), cobalto (^{57}Co o ^{58}Co), hierro (^{59}Fe), selenio (^{75}Se) o galio (^{67}Ga). Los radioisótopos útiles como agentes terapéuticos incluyen itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio, astato (^{211}At), renio (^{186}Re), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi) y rodio (^{188}Rh). Los radioisótopos útiles como marcadores, por ejemplo, para su uso en diagnósticos, incluyen yodo (^{131}I o ^{125}I), indio (^{111}In), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), fósforo (^{32}P), carbono (^{14}C) y tritio (^3H) o uno o más de los isótopos terapéuticos listados anteriormente.
- La radioinmunoterapia (RIT) que usa anticuerpos marcados con ^{131}I , ^{90}Y y ^{177}Lu se está investigando clínicamente con gran intensidad. Hay diferencias significativas en las características físicas de estos tres núclidos y como resultado, puede ser importante la elección del radionúclido para administrar una dosis máxima de radiación al tumor. Las partículas beta de mayor energía del ^{90}Y pueden ser buenas para tumores voluminosos, pero puede no ser necesario para tumores pequeños y especialmente, metástasis óseas. Las partículas beta con relativamente baja energía del ^{131}I son ideales, pero *in vivo*, la deshalogenación de moléculas radioyodadas es una importante desventaja para internalizar el anticuerpo. Por el contrario, ^{177}Lu tiene partículas beta de baja energía con un alcance de tan solo 0,2-0,3 mm y administra una dosis de radiación mucho más baja a la médula ósea en comparación con ^{90}Y . Además, debido a la mayor semivida física (en comparación con ^{90}Y), los tiempos de residencia en el tumor son más prolongados. Como resultado, pueden administrarse mayores actividades (más cantidades de mCi) de agentes marcados con ^{177}Lu con una dosis de radiación comparativamente más baja a la médula ósea. Hay varios estudios clínicos que investigan el uso de anticuerpos marcados con ^{177}Lu en el tratamiento de diversos cánceres. (Mulligan T et al. *Clin Cancer Res.* 1: 1447-1454(1995); Meredith RF, et al. *J Nucl Med* 37:1491-1496(1996); Alvarez RD, et al. *Gynecologic Oncology* 65: 94-101(1997)).
- Los agentes detectables útiles con los que puede derivatizarse (o marcarse) un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención incluyen compuestos fluorescentes, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, átomos metálicos emisores de fluorescencia, por ejemplo, europio (Eu) y otros lantánidos y materiales radiactivos (descritos anteriormente). Los agentes detectables fluorescentes incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalenosulfonilo, ficoeritrina y similares. También puede derivatizarse un anticuerpo con enzimas detectables, tales como fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, β -galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa y similares. Cuando se derivatiza un anticuerpo con una enzima detectable, se detecta añadiendo reactivos adicionales que usa la enzima para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable, peroxidasa de rábano picante, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina genera un producto de reacción coloreado, que es detectable. También puede derivatizarse un anticuerpo con un grupo prostético (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, puede derivatizarse un anticuerpo con biotina y detectarse mediante la medición indirecta de la unión de avidina o estreptavidina. Los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aecurina.

En otro aspecto, la invención presenta composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunocombinado del mismo, como se describe en el presente documento, formulados junto con un portador farmacéuticamente aceptable. La presente divulgación describe que, la molécula de anticuerpo anti-GCC es una con las características ejemplares resumidas en las tablas 1 y 2.

Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. El portador puede ser adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). La composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes adicionales, por ejemplo, sales, tampones, modificadores de la tonicidad, lioprotectores, detergentes no iónicos, tensioactivos y conservantes.

Las composiciones pueden encontrarse en diversas formas. Estas incluyen, por ejemplo, formas farmacéuticas líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables e infusibles), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferente depende del modo previsto de administración y de la aplicación terapéutica. Algunas composiciones típicas se encuentran en forma de soluciones inyectables o infusibles, previstas para administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En algunas realizaciones, el anticuerpo se administra mediante infusión o inyección intravenosa. En otras realizaciones, el anticuerpo se administra mediante inyección intramuscular o subcutánea.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento, se refieren a modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es estéril y estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, microesfera u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de anticuerpo. Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo (es decir, anticuerpo o porción de anticuerpo) en la cantidad requerida y en un disolvente adecuado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización, por ejemplo, mediante filtración. En general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación proporcionados son secado al vacío y criodesecado, que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución de los mismos previamente esterilizado por filtración. Puede mantenerse la fluidez adecuada de una solución, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de una dispersión y mediante el uso de tensioactivos. Se puede lograr la absorción prolongada de composiciones inyectables incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Los anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de la presente invención pueden administrarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/modo de administración es inyección o infusión intravenosa. Como apreciarán lo expertos en la materia, la vía y/o el modo de administración variará dependiendo de los resultados deseados. En ciertas realizaciones, el compuesto activo puede prepararse con un portador que protegerá al compuesto frente a su rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de suministro microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones están patentados o se conocen generalmente por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

En ciertas realizaciones, puede administrarse por vía oral una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunocombinado descrito en el presente documento, por ejemplo, con un diluyente inerte o un transportador comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también puede atraparse en una cápsula de gelatina de vaina dura o blanda, prensarse en comprimidos, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Para administrar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención por una vía distinta a la administración parenteral, puede ser necesario recubrir el compuesto o administrarlo conjuntamente con, un material para impedir su inactivación.

Las composiciones terapéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas pueden disponerse dentro de un dispositivo, por ejemplo, un contenedor hermético al aire o a líquidos, que contiene una o más dosis. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, sin limitación, viales, cánulas, agujas, bolsas para goteros y vías. La presente divulgación describe métodos para colocar

una molécula de anticuerpo o un inmunoconjugado descrito en el presente documento en dicho dispositivo.

La presente divulgación describe que una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado descrito en el presente documento, se formula en una composición liposómica. La presente divulgación describe que, el liposoma está recubierto con la molécula de anticuerpo. La presente divulgación describe que, el liposoma se rellena con un agente terapéutico. El suministro liposómico puede permitir la administración de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que no está unido al anticuerpo. Este enfoque puede usarse para suministrar un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que no es susceptible a la reticulación con la molécula de anticuerpo o un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que se va a secuestrar o cuyo contacto con células no diana debe minimizarse. La presente divulgación describe que, el liposoma se rellena con un agente citostático o citotóxico. La presente divulgación describe que, el agente terapéutico se selecciona entre el grupo que consiste en maitansinoides, auristatinas, dolastatinas, duocarmicinas, criptoficinas, taxanos, agentes alquilantes de ADN, calicheamicinas y derivados de los anteriores. La presente divulgación describe que, el liposoma se rellena con una secuencia de ácido nucleico que comprende moléculas de ARN de interferencia, por ejemplo, moléculas antisentido, ARNip, ARNhc o moléculas de miARN, que son capaces de reducir la expresión de GCC o la expresión de otro gen, por ejemplo, un oncogén, en células que expresan GCC. La presente divulgación describe que, el liposoma se recubre o rellena con un inmunoconjugado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente o marcador terapéutico.

Las pautas posológicas se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas a lo largo del tiempo o se puede reducir o aumentar proporcionalmente la dosis según se indique por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en forma de dosis unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La expresión "forma farmacéutica unitaria", como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que se vayan a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el transportador farmacéutico necesario. La especificación para las formas farmacéuticas unitarias de la presente divulgación está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y del efecto terapéutico concreto que se vaya a lograr y de (b) las limitaciones inherentes en la técnica de formar compuestos de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Un intervalo ejemplar no limitante para una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención es de 0,1-20 mg/kg o 1-10 mg/kg. Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar dependiendo del tipo y la gravedad de la afección que se vaya a aliviar. Además, hay que entender que, para cualquier sujeto concreto, deben ajustarse las pautas posológicas específicas con el paso del tiempo según las necesidades del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son únicamente ilustrativos y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno de la invención. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a las dosis y durante los periodos de tiempo necesarios, para lograr el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo modificado o el fragmento de anticuerpo puede variar dependiendo de factores tales como la patología, la edad, el sexo y el peso del individuo y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es también una en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo modificado o el fragmento de anticuerpo se ve sobrepasado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una "dosis terapéuticamente eficaz" inhibe preferentemente un parámetro medible (por ejemplo, velocidad de crecimiento tumoral) en sujetos tratados en al menos aproximadamente un 20 %, al menos aproximadamente un 40 %, al menos aproximadamente un 60 % y en algunas realizaciones, al menos aproximadamente un 80 %, en relación con sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro medible, por ejemplo, cáncer, puede evaluarse en un sistema de modelo animal con capacidad predictiva de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir, dicha inhibición *in vitro* mediante ensayos conocidos por el experto en la materia.

También se encuentran dentro del alcance de la invención kits que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado como se cita en las reivindicaciones. Además, se divulgan kits que comprenden composiciones de liposomas que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado. El kit puede incluir uno o más elementos que incluyen: instrucciones de uso; otros reactivos, por ejemplo, un marcador, un agente terapéutico o un agente útil para quelar o de otro modo acoplar, un anticuerpo a un marcador o agente terapéutico o una composición radioprotectora; dispositivos u otros materiales para preparar el anticuerpo para su administración; portadores farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para su administración a un sujeto. Las instrucciones de uso pueden incluir instrucciones para aplicaciones diagnósticas de la molécula de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado para detectar GCC, *in vitro*, por ejemplo, en una muestra, por ejemplo, una biopsia o células de un paciente que tiene un cáncer o *in vivo*. Las instrucciones pueden incluir orientación para la aplicación terapéutica, incluyendo dosis y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente con un cáncer (por ejemplo, un

cáncer de origen gastrointestinal, tal como, por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago). Otras instrucciones pueden incluir instrucciones acerca del acoplamiento del anticuerpo a un quelador, un marcador o un agente terapéutico o para la purificación de un anticuerpo conjugado, por ejemplo, a partir de componentes de conjugación sin reaccionar. Como se analizó anteriormente, el kit puede incluir un marcador, por ejemplo, cualquiera de los marcadores descritos en el presente documento. Como se analizó anteriormente, el kit puede incluir un agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico descrito en el presente documento. En algunas aplicaciones, se hará reaccionar el anticuerpo con otros componentes, por ejemplo, un quelante o un marcador o agente terapéutico, por ejemplo, un radioisótopo, por ejemplo, itrio o lutecio. En dichos casos, el kit puede incluir uno o más de un vaso de reacción para llevar a cabo la reacción o un dispositivo de separación, por ejemplo, una columna de cromatografía, para su uso en la separación del producto terminado a partir de los materiales de partida o intermedios de reacción.

El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico o terapéutico como se describe en el presente documento y/o una o más moléculas de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugados adicionales, formulados según sea adecuado, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

El kit puede contener además un radioprotector. La naturaleza radiolítica de los isótopos, por ejemplo, ⁹⁰Yttrio (⁹⁰Y) es conocida. Para superar esta radiólisis, pueden incluirse radioprotectores, por ejemplo, en el tampón de reacción, en tanto que dichos radioisótopos sean benignos, lo que significa que no inhiben o de otro modo afectan de manera adversa a la reacción de marcaje, por ejemplo, de un isótopo, tal como de ⁹⁰Y, al anticuerpo. El tampón de formulación de la presente divulgación puede incluir un radioprotector, tal como seroalbúmina humana (HSA) o ascorbato, que minimiza la radiólisis causada por el itrio u otros radionúclidos fuertes. Se conocen en la técnica otros radioprotectores y también pueden usarse en el tampón de formulación de la presente divulgación, es decir, depuradores de radicales libres (fenol, sulfitos, glutatión, cisteína, ácido genticóico, ácido nicotínico, palmitato de ascorbilo, HOP(:O)H₂l glicerol, formaldehído sulfoxilato de sodio, Na₂S₂O, Na₂S₂O₃ y SO₂, etc.).

Un kit proporcionado es uno útil para radiomarcado una proteína o péptido conjugada a quelador con un radioisótopo terapéutico para su administración a un paciente. El kit incluye (i) un vial que contiene anticuerpo conjugado al quelador, (ii) un vial que contiene tampón de formulación para estabilizar y administrar el anticuerpo radiomarcado a un paciente y (iii) instrucciones para llevar a cabo el procedimiento de radiomarcado. El kit posibilita la exposición de un anticuerpo conjugado a quelador al radioisótopo o una sal del mismo durante una cantidad de tiempo suficiente en condiciones beneficiosas, por ejemplo, como se recomienda en las instrucciones. Se produce un anticuerpo radiomarcado que tiene suficiente pureza, actividad específica y especificidad de unión. El anticuerpo radiomarcado puede diluirse hasta una concentración adecuada, por ejemplo, en tampón de formulación y se administra directamente al paciente con o sin purificación adicional. El anticuerpo conjugado al quelador puede suministrarse en forma liofilizada.

Usos

Las moléculas de anticuerpo anti-GCC descritas en el presente documento tienen utilidades de diagnóstico, pronóstico, obtención de imágenes, terapéuticas y profilácticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas de anticuerpo pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo* o administrarse a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir y/o diagnosticar una variedad de trastornos.

Las moléculas de anticuerpo, los inmunoconjugados y las proteínas de fusión descritas en el presente documento pueden usarse para modular una actividad o función de una proteína GCC, tal como unión al ligando (por ejemplo, unión de ST o guanilina), transducción de señales mediada por GCC, mantenimiento del fluido intestinal, homeostasia de electrolitos, liberación de calcio intracelular (flujo de calcio), diferenciación celular, proliferación celular o activación celular.

La presente divulgación describe un método para eliminar, inhibir o modular el crecimiento de o interferir con el metabolismo de, una célula que expresa GCC. La presente divulgación describe un método para inhibir la señalización celular mediada por GCC o un método para eliminar una célula. El método puede usarse con cualquier célula o tejido que expresa GCC, tal como una célula cancerosa (por ejemplo, una célula de un cáncer del sistema gastrointestinal, tal como, por ejemplo, un cáncer de colon, estómago o esófago o una célula pancreática) o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de células que expresan GCC incluyen células de adenocarcinoma de colon humano T84, células de tumor de colon frescas o congeladas y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica GCC o una porción de la misma.

Los métodos de la presente divulgación incluyen las etapas de poner en contacto la célula con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo, como se describe en el presente documento, en una cantidad eficaz, es decir, una cantidad suficiente para inhibir la señalización celular mediada por GCC o una cantidad suficiente para eliminar a la célula. El método puede usarse en células en cultivo, por ejemplo, *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* o *in situ*. Por ejemplo, las células que expresan GCC (por ejemplo, células recogidas mediante biopsia de un tumor o una lesión metastásica; células de una línea celular de cáncer establecida; o células recombinantes), pueden cultivarse *in vitro* en medio de cultivo y la etapa de puesta en contacto puede efectuarse añadiendo la molécula de anticuerpo anti-GCC

o el inmunoconjugado al medio de cultivo. En los métodos de eliminación de una célula, el método comprende usar una molécula de anticuerpo anti-GCC desnuda o un inmunoconjugado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente citotóxico. El método dará como resultado la eliminación de células que expresan GCC, incluyendo, en particular, células tumorales que expresan GCC (por ejemplo, células tumorales de colon).

La referencia a la tabla 7 puede servir como guía para seleccionar anticuerpos para usarlos para diversos métodos. Por ejemplo, la tabla 7 indica qué anticuerpos se confirmó que se internalizaban después de la unión a GCC. Dichos anticuerpos pueden ser útiles cuando se ligan a un resto citotóxico o a un resto para la obtención de imágenes de células. Los anticuerpos que no se internalizan pueden usarse para fines de diagnóstico o métodos terapéuticos usando anticuerpo desnudo diseñado para provocar una respuesta citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpo o quizá para métodos de administración de liposomas.

Las moléculas de anticuerpo anti-GCC de la presente invención se unen a dominios extracelulares de GCC o porciones de los mismos en células que expresan el antígeno. Como resultado, cuando se ponen en práctica los métodos de la presente divulgación para eliminar, suprimir o detectar células cancerosas, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, se unen a todas estas células, no solo a células que están fijadas o a células cuyos dominios antigénicos intracelulares están expuestos de otro modo al ambiente extracelular. Por consiguiente, la unión de los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno, se concentra en áreas donde hay células que expresan GCC, independientemente de si estas células están fijadas o sin fijar, sean viables o necróticas. Además o como alternativa, las moléculas de anticuerpo anti-GCC, se unen a y se internalizan con GCC tras la unión a células que expresan el antígeno.

El método también puede llevarse a cabo en células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo*. La presente divulgación describe que, el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un antígeno GCC con el que reacciona de manera cruzada una molécula de anticuerpo anti-GCC divulgada en el presente documento. Una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo puede administrarse a un sujeto humano con fines terapéuticos. También puede administrarse una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado a un mamífero no humano que expresa el antígeno similar a GCC con el que reacciona de manera cruzada el anticuerpo (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con fines veterinarios o como un modelo animal de enfermedad humana. Los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, ensayo de dosis y tiempos de administración). La presente divulgación describe que *in vivo*, la etapa de puesta en contacto se efectúa en un sujeto e incluye administrar una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma al sujeto en condiciones eficaces para permitir tanto la unión de la molécula al dominio extracelular de la GCC expresada en la célula como el tratamiento de la célula.

En una realización, la invención proporciona una molécula de anticuerpo, un inmunoconjugado o una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer mediante la administración de una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente citotóxico a un paciente que necesita dicho tratamiento. El método puede usarse para el tratamiento de cualquier trastorno canceroso que incluye al menos algunas células que expresan el antígeno de GCC. Como se usa en el presente documento, se pretende que el término "cáncer" incluya todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos u órganos transformados a malignos, independientemente del tipo histopatológico o del estadio de invasividad. Los términos "cáncer" y "tumor" pueden usarse indistintamente (por ejemplo, cuando se usan en el contexto de métodos de tratamiento, "tratamiento de un cáncer" y "tratamiento de un tumor" tienen el mismo significado).

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo, un inmunoconjugado o una composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del sujeto, reducir el número o el tamaño de las lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga tumoral primaria, reducir la invasividad, prolongar el tiempo de supervivencia o mantener o mejorar la calidad de vida.

Los ejemplos de trastornos cancerosos incluyen, pero sin limitación, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos o lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen neoplasias malignas, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, tales como aquellos que afectan al colon y al páncreas. Los adenocarcinomas incluyen neoplasias malignas, tales como carcinoma de pulmón no microcítico. Las lesiones metastásicas de los cánceres mencionados anteriormente también se pueden tratar o prevenir usando los métodos y composiciones de la invención. En algunas realizaciones, el cáncer que se va a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de esófago o cáncer de estómago). En algunas realizaciones, el cáncer es pancreático.

En una realización, el cáncer es un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomioma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal o un tumor neuroendocrino colorrectal. En una realización particular, el cáncer es cáncer de colon metastásico. En otra realización, el cáncer es un cáncer de estómago (por ejemplo, adenocarcinoma gástrico, linfoma o sarcoma) o metástasis del mismo. En otra realización, el cáncer es un cáncer de esófago (por ejemplo, un carcinoma escamocelular o adenocarcinoma del esófago).

El método puede ser útil en el tratamiento de un trastorno relevante en cualquier estadio o subclasificación. Por

ejemplo, el método puede usarse para tratar el cáncer de colon en estadio temprano o tardío o cáncer de colon de cualquiera de los estadios 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC y IV.

La presente divulgación describe que, el método para tratar el cáncer (por ejemplo, colorrectal, esofágico o cáncer de estómago) comprende administrar a un paciente que necesite dicho tratamiento una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento. La presente divulgación describe que, el método comprende administrar un inmunocombinado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento y un agente citotóxico. La presente divulgación describe que, el inmunocombinado se caracteriza por la fórmula (I), como se describe en el presente documento. La presente divulgación describe que, el inmunocombinado se caracteriza por la fórmula (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6) o (I-7) como se describe en el presente documento. La presente divulgación describe que, el inmunocombinado se caracteriza por la fórmula (I), (I-1), (I-2), (I-3), (I-4), (I-5), (I-6) o (I-7), en donde la variable Ab es una molécula de anticuerpo con características resumidas en las tablas 1 a 6. En ciertas realizaciones, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9. La presente divulgación describe que, el inmunocombinado se caracteriza por la fórmula (I-5) o (I-7), en donde la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9.

Los métodos de administración de moléculas de anticuerpo e inmunocombinados se han descrito anteriormente. Las dosis adecuadas de las moléculas usadas dependerán de la edad y el peso del sujeto y del compuesto particular usado.

En algunas realizaciones, las moléculas de anticuerpo anti-GCC o el inmunocombinado para su uso en el tratamiento de un trastorno se administra en ciclos de tratamiento. Un "ciclo de tratamiento" consiste en un periodo de tratamiento, durante el cual se administra la molécula de anticuerpo anti-GCC o el inmunocombinado como se ha descrito anteriormente, seguido de un periodo de reposo, durante el cual no se administra la molécula de anticuerpo anti-GCC o el inmunocombinado. El ciclo de tratamiento puede repetirse según sea necesario para lograr el efecto deseado.

Los anticuerpos anti-GCC descritos en el presente documento (por ejemplo, moléculas de anticuerpo anti-GCC desnudas o inmunocombinados que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente terapéutico) pueden usarse en combinación con otras terapias. Por ejemplo, la terapia combinada puede incluir una composición de la presente invención coformulada y/o coadministrada con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes contra el cáncer, por ejemplo, agentes citotóxicos o citostáticos, tratamiento hormonal, vacunas y/u otras inmunoterapias. En otras realizaciones, los anticuerpos anti-GCC se administran en combinación con otras modalidades de tratamiento terapéutico, incluyendo cirugía, radiación, criocirugía y/o termoterapia. Dichas terapias combinadas pueden utilizar ventajosamente dosis menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Administrado "en combinación", como se usa en el presente documento, significa que se administran dos (o más) tratamientos diferentes al sujeto durante el transcurso de la afectación del sujeto con el trastorno, por ejemplo, los dos o más tratamientos se administran después de que se haya diagnosticado el trastorno al sujeto y antes de que el trastorno se haya curado o eliminado. En algunas realizaciones, se sigue produciendo el suministro de un tratamiento cuando comienza el suministro del segundo, de tal forma que hay solapamiento. En ocasiones esto se cita en el presente documento como administración "simultánea" o "concurrente". En otras realizaciones, la administración de un tratamiento termina antes de que comience la administración del otro tratamiento. En algunas realizaciones de cualquiera de los dos casos, el tratamiento es más eficaz debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más eficaz, por ejemplo, se observa un efecto equivalente con menos cantidad del segundo tratamiento o el segundo tratamiento reduce en mayor medida los síntomas, de lo que podría observarse si se administrase el segundo tratamiento en ausencia del primer tratamiento o se observa la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas realizaciones, el suministro es de tal modo que la reducción de un síntoma u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor que la que podría observarse con un tratamiento administrado en ausencia del otro. El efecto de los dos tratamientos puede ser parcialmente aditivo, totalmente aditivo o más que aditivo. La administración puede ser de tal modo que sigue siendo detectable un efecto del primer tratamiento cuando se administra el segundo.

En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-GCC o el inmunocombinado del mismo se usa en combinación con un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos y doxorubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida); intercaladores de ADN (por ejemplo, cisplatino, oxaliplatino y carboplatino); intercaladores de ADN y generadores de radicales libres, tales como bleomicina; y miméticos de nucleósidos (por ejemplo, 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea).

Los agentes quimioterapéuticos que interrumpen la replicación celular incluyen: paclitaxel, docetaxel y análogos relacionados; vincristina, vinblastina y análogos relacionados; talidomida, lenalidomida y análogos relacionados (por ejemplo, CC-5013 y CC-4047); inhibidores de tirosina cinasa (por ejemplo, mesilato de imatinib y gefitinib); inhibidores del proteasoma (por ejemplo, bortezomib); inhibidores de NF- κ B, incluyendo inhibidores de I κ B cinasa; anticuerpos

que se unen a proteínas sobreexpresadas en cánceres y que de este modo regulan negativamente la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas que se sabe que están reguladas positivamente, sobreexpresadas o activadas en los cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.

5 La selección de agentes terapéuticos o la modalidad de tratamiento que se va a combinar con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la invención dependerá del trastorno que se vaya a tratar. Los agentes adicionales o la modalidad de tratamiento pueden incluir, por ejemplo, terapias aprobadas convencionales para la indicación que se esté tratando. Por ejemplo, cuando la molécula de anticuerpo anti-GCC o el inmunoconjugado del mismo se usa para tratar cáncer de colon, puede usarse en combinación con, por ejemplo, cirugía; radioterapia; 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, platino o combinaciones de los mismos (por ejemplo, oxaliplatino/capecitabina (XELOX), 5-fluorouracilo/leucovorina.

10 En otro aspecto, la invención presenta el uso de una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado como se describe en el presente documento en la fabricación de un medicamento. En una realización, el medicamento es para tratar el cáncer, por ejemplo, un cáncer gastrointestinal. En algunas realizaciones, el medicamento comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención que tiene las características resumidas en las tablas 1-6. En algunas realizaciones, el medicamento comprende una molécula de anticuerpo 5F9.

15 Los anticuerpos anti-GCC y los inmunoconjugados descritos en el presente documento pueden usarse para detectar la presencia de GCC, por ejemplo, para detectar la presencia de GCC en una muestra biológica o para detectar la presencia o distribución de GCC en un sujeto. El término "detectar", como se usa en el presente documento, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. La detección de GCC o de proteína GCC, como se usa en el presente documento, significa detectar proteína GCC intacta o detectar una porción de la proteína GCC que comprende el epítipo al que se une la molécula de anticuerpo anti-GCC.

20 Por consiguiente, la presente divulgación describe un método para detectar la proteína GCC, por ejemplo, detectar una célula o tejido que expresa GCC, por ejemplo, una célula tumoral o un tumor que tiene células, que expresan GCC. El método comprende: poner en contacto un materia, por ejemplo, una célula o tejido, por ejemplo, una muestra de un tumor que expresa GCC, con una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en el presente documento, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre la molécula de anticuerpo anti-GCC y la proteína GCC; y detectar la formación de un complejo entre la molécula de anticuerpo y la proteína GCC, para de este modo detectar la presencia de proteína GCC, por ejemplo, para detectar una célula o tumor que expresa GCC.

25 La presente divulgación describe que la molécula de anticuerpo anti-GCC es un inmunoconjugado que comprende un marcador detectable.

30 La presente divulgación describe que, los tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan GCC a mayores niveles en relación con otros tejidos, por ejemplo, otros tejidos, tales como linfocitos B y/o tejidos asociados con linfocitos B.

35 Los métodos de detección descritos en el presente documento, ya sean *in vitro* o *in vivo*, pueden usarse para evaluar a un sujeto. La presente divulgación describe que el método se lleva a cabo *in vivo* y puede usarse, por ejemplo, para obtener imágenes, estadificar, evaluar o diagnosticar a un paciente. La presente divulgación describe que, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, tal como un cáncer o un tumor, por ejemplo, cáncer de colon.

40 Por lo tanto, la presente divulgación describe, un método para detectar la presencia de proteína GCC *in vitro* (por ejemplo, en una muestra biológica, tal como una biopsia tisular, por ejemplo, de un tejido tumoral, de un sujeto) o *in vivo* (por ejemplo, mediante obtención de imágenes *in vivo* en un sujeto). El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo o administrar a un sujeto, una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo; y (ii) detectar la formación de un complejo entre la molécula de anticuerpo anti-GCC y la proteína GCC. La formación de complejos es indicativa de la presencia o nivel de GCC.

45 La presente divulgación describe que el nivel de complejo detectado en la muestra o sujeto se compara con un valor de referencia, por ejemplo, un valor para la formación de complejo o el nivel de GCC. La presente divulgación describe que un nivel de GCC que supera un valor de referencia es indicativo de un trastorno mediado por GCC.

50 La presente divulgación describe que el método comprende poner en contacto una muestra de referencia, por ejemplo, una muestra de control (por ejemplo, una muestra biológica de control, tal como plasma, tejido, biopsia) o un sujeto de control) con una molécula de anticuerpo anti-GCC o el inmunoconjugado del mismo y comparar el nivel de complejo detectado en la misma con el nivel detectado en la muestra o el sujeto.

55 La presente divulgación describe que, se obtiene una célula o tejido de ensayo de un individuo que se sospecha que tiene un trastorno asociado con la expresión aumentada de GCC.

La presente divulgación describe que el nivel de GCC, en una muestra del sujeto o dentro del sujeto, se compara con un nivel de referencia, por ejemplo, el nivel de GCC en un material de control, por ejemplo, una célula normal del mismo origen tisular que la célula del sujeto o una célula que tiene GCC a niveles comparables con dicha célula normal. El método puede comprender, por ejemplo, en respuesta al nivel detectado de GCC, proporcionar un diagnóstico, un pronóstico, una evaluación de la eficacia del tratamiento o la determinación del estadio de un trastorno. Un mayor nivel de GCC en la muestra o el sujeto, en comparación con el material de control, indica la presencia de un trastorno asociado con la expresión aumentada de GCC. Un mayor nivel de GCC en la muestra o el sujeto, en comparación con el material de control, también puede indicar, la ausencia relativa de eficacia de un tratamiento, un pronóstico relativamente peor o un estadio más tardío de la enfermedad. También puede usarse el nivel de GCC para evaluar o seleccionar el futuro tratamiento, por ejemplo, la necesidad de un tratamiento más o menos agresivo o la necesidad de cambiar de un régimen de tratamiento a otro.

También puede usarse el nivel de GCC para seleccionar o evaluar a pacientes. Por ejemplo, la presente divulgación describe que los pacientes cuyas células tumorales expresan altas cantidades de GCC en sus superficies podrían considerarse buenos candidatos para el tratamiento con moléculas de anticuerpo anti-GCC conjugadas a toxinas. La presente divulgación describe que los pacientes cuyas células tumorales expresan bajas cantidades de GCC en sus superficies no serán tan buenos candidatos para esto o pueden ser candidatos para combinar la molécula de anticuerpo anti-GCC con un método de tratamiento adicional o pueden ser candidatos para terapia con anticuerpo desnudo. En otro ejemplo, la dosis de la molécula de anticuerpo anti-GCC conjugado a toxina puede ajustarse para reflejar el número de moléculas de GCC expresadas en las superficies de células tumorales. Los pacientes con altos números de moléculas de GCC en sus superficies de células tumorales pueden tratarse con dosis menores que los pacientes con bajos números de moléculas de GCC. La detección de la presencia de células tumorales que expresan GCC *in vivo* puede permitir la identificación de tejidos en los que ha metastatizado el tumor primario que expresa GCC. El conocimiento de qué tejidos tienen metástasis puede dar lugar a la aplicación dirigida de terapia contra el tumor.

Como se analizó anteriormente, las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento permiten la evaluación de la presencia de una proteína GCC en tejidos normales frente a neoplásicos, mediante lo que puede evaluarse la presencia o la gravedad de la enfermedad, el progreso de la enfermedad y/o la eficacia de la terapia. Por ejemplo, puede monitorizarse la terapia y evaluarse la eficacia. En un ejemplo, puede detectarse y/o medirse una proteína GCC en una primera muestra obtenida de un sujeto que tiene una enfermedad inflamatoria y puede iniciarse la terapia. Posteriormente, puede obtenerse una segunda muestra del sujeto y puede detectarse y/o medirse la proteína GCC en la muestra. Una reducción en la cantidad de proteína GCC detectada o medida en la segunda muestra puede ser indicativa de la eficacia terapéutica.

Los trastornos proliferativos celulares ejemplares que pueden evaluarse, por ejemplo, diagnosticarse, usando un anticuerpo divulgado en el presente documento incluyen un trastorno proliferativo que incluye, pero sin limitación, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago.

La presente divulgación describe que, un método, tal como los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-GCC a GCC expresado en la superficie de una célula o en una preparación de membrana obtenida de una célula que expresa GCC en su superficie. La presente divulgación describe que, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-GCC en condiciones que permiten la unión del anticuerpo anti-GCC a GCC y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-GCC y GCC en la superficie celular. Un ensayo ejemplar para detectar la unión de un anticuerpo anti-GCC a GCC expresada en la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

Las muestras ejemplares para los métodos descritos en el presente documento comprenden tejido o fluido corporal, tal como exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, muestra de heces o biopsia. En un ejemplo, una muestra (por ejemplo, tejido y/o fluido corporal) puede obtenerse de un individuo y puede usarse un método inmunológico adecuado para detectar y/o medir la expresión de proteína GCC. Los métodos inmunológicos adecuados para detectar o medir la expresión de proteína GCC incluyen ensayos inmunosorbentes ligados a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo, inmunohistología, citometría de flujo y similares.

Las moléculas de anticuerpo anti-GCC usadas en los métodos descritos en el presente documento, por ejemplo, en la detección *in vivo* e *in vitro*, por ejemplo, métodos diagnósticos, de estadificación o de obtención de imágenes, pueden marcarse directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del agente de unión unido o no unido. Las sustancias detectables adecuadas incluyen diversas enzimas biológicamente activas, ligandos, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales quimioluminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales cromóforos, materiales densos a electrones, materiales paramagnéticos (por ejemplo, activos en resonancia magnética nuclear) y materiales radiactivos. En algunas realizaciones, la molécula de anticuerpo anti-GCC se acopla a un ion radiactivo, por ejemplo, indio (^{111}In), yodo (^{131}I o ^{125}I), itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^3H), rodio (^{188}Rh), tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$), praseodimio o fósforo (^{32}P); o un radionúclido emisor de positrones, por ejemplo, carbono-11 (^{11}C), potasio-40 (^{40}K), nitrógeno-13 (^{13}N), oxígeno-15 (^{15}O), flúor-18 (^{18}F) y yodo-121 (^{121}I).

- Los marcadores ejemplares incluyen fluoróforos, tales como quelatos de tierras raras y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbelliferona, luciferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnaga y luciferasa bacteriana (Patente de los Estados Unidos n.º 4.737.456), luciferina y 2,3-dihidroftalazindionas. Otros marcadores ejemplares incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, sacárido oxidasas, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas, tales como uricasa y xantina oxidasa, acoplados con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de colorante, tal como HRP, lactoperoxidasa o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de espín, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables y similares.
- Las moléculas de anticuerpo marcadas con fluoróforo o cromóforo pueden prepararse a partir de restos convencionales conocidos en la técnica. Ya que los anticuerpos y otras proteínas absorben luz que tiene longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, los restos fluorescentes deben seleccionarse para que tengan una absorción sustancial a longitudes de onda por encima de 310 nm y preferentemente, por encima de 400 nm. Se describe una variedad de compuestos fluorescentes y cromóforos adecuados por Stryer Science, 162:526 (1968) y Brand, L. et al. Annual Review of Biochemistry, 41:843-868 (1972). Los anticuerpos pueden marcarse con grupos cromóforos fluorescentes mediante procedimientos convencionales, tales como los divulgados en las Patentes de los Estados Unidos n.º 3.940.475, 4.289.747 y 4.376.110.
- Un grupo de compuestos fluorescentes que tiene varias de las propiedades deseables descritas anteriormente es el de los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas derivadas de 3,6-dihidroxi-9-henilxanthidrol y resaminas y rodaminas derivadas de 3,6-diamino-9-fenilxanthidrol y lisamina rodamina B. Los derivados de rodamina y fluoresceína de 9-O-carboxifenilxanthidrol tienen un grupo 9-O-carboxifenilo. Se encuentran fácilmente disponibles compuestos de fluoresceína que tienen grupos de acoplamiento reactivos, tales como grupos amino e isotiocianato, tales como isotiocianato de fluoresceína y fluorescamina. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición α o β .
- Pueden usarse moléculas de anticuerpo marcadas, por ejemplo, de manera diagnóstica y/o experimental en una serie de contextos, incluyendo (i) para aislar un antígeno predeterminado mediante técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación; (ii) para detectar un antígeno predeterminado (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante celular) para evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la proteína; (iii) para monitorizar los niveles de proteína en tejidos como parte de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo, para determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado.
- Pueden usarse otros métodos concretos para detectar la unión de anticuerpos anti-GCC a GCC. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, ensayos de unión a antígeno que se conocen en la técnica, tales como transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC).
- La formación de complejos entre la molécula de anticuerpo anti-GCC y GCC puede detectarse midiendo o visualizando o bien el anticuerpo (o el fragmento de anticuerpo) unido al antígeno de GCC o la molécula de anticuerpo no unida. Pueden usarse ensayos de detección convencionales, por ejemplo, transferencias de Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunosorbente ligado a enzimas), inmunoensayos en "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, ensayos inmunológicos fluorescentes, inmunoensayos de proteína A e inmunohistoquímica (IHC) o radioinmunoensayo (RIA).
- Como alternativa al marcaje de la molécula de anticuerpo anti-GCC, puede ensayarse la presencia de GCC en una muestra mediante un inmunoensayo de competición que utiliza patrones marcados con una sustancia detectable y una molécula de anticuerpo anti-GCC no marcada. En este ensayo, la muestra biológica, los patrones marcados y el agente de unión a GCC se combinan y se determina la cantidad de patrón marcado unido al anticuerpo no marcado. La cantidad de GCC en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de patrón marcado unido al agente de unión a GCC.
- También es posible detectar directamente la formación de complejos de GCC a molécula de anticuerpo anti-GCC sin manipulación o marcaje adicional de cualquiera de los componentes (GCC o la molécula de anticuerpo), por ejemplo, utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (FET, véase, por ejemplo, Lakowicz et al., la Patente de los Estados Unidos n.º 5.631.169; Stavrianopoulos, et al., la Patente de los Estados Unidos n.º 4.868.103). Un marcador fluoróforo en la primera molécula "donante" se selecciona de tal forma que, tras la excitación con luz incidente de una longitud de onda adecuada, se absorberá su energía fluorescente emitida por un marcador fluorescente en una segunda molécula "aceptora", que a su vez es capaz de emitir fluorescencia debido a la energía absorbida. Como alternativa, la molécula de proteína "donante" puede simplemente utilizar la energía fluorescente natural de restos de triptófano. Se seleccionan marcadores que emiten diferentes longitudes de onda de luz, de tal forma que el marcador de la molécula "aceptora" puede diferenciarse del de la "donante". Ya que la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores está relacionada con la distancia que separa las moléculas, pueden abordarse relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en la que se produce unión entre las moléculas, la emisión fluorescente del marcador de la molécula "aceptora" en el ensayo ha de ser máxima. Puede medirse un

evento de unión de FET mediante medios de detección fluorométricos convencionales bien conocidos en la técnica (por ejemplo, usando un fluorímetro).

En otro ejemplo, puede lograrse la determinación de la capacidad de una molécula de anticuerpo para reconocer a GCC sin marcar cualquiera de los componentes del ensayo (GCC o molécula de anticuerpo) utilizando una tecnología tal como ensayo de interacción biomolecular (BIA) en tiempo real (véase, por ejemplo, Sjolander, S. y Urbaniczky, C., 1991, Anal. Chem. 63:2338-2345 y Szabo et al., 1995, Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705). Como se usa en el presente documento, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcaje de cualquiera de las moléculas que interactúan (por ejemplo, BIACORE™). Los cambios en la masa en la superficie de unión (que indican un evento de unión) dan como resultado alteraciones del índice refractivo cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)), dando como resultado una señal detectable que puede usarse como indicación de las reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

La presente divulgación describe un método para detectar la presencia de tejidos tumorales que expresan GCC *in vivo*. El método incluye (i) administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente que tiene un cáncer) un anticuerpo anti-GCC o un fragmento de unión a antígeno del mismo, preferentemente un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo conjugado a una etiqueta o marcador detectable; (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicha etiqueta o marcador detectable para los tejidos o células que expresan GCC.

Los ejemplos de marcadores útiles para obtener imágenes de diagnóstico de acuerdo con la presente invención son radiomarcadores, tales como ¹³¹I, ¹¹¹In, ⁶⁸Ga, ¹²³I, ^{99m}Tc, ³²P, ¹²⁵I, ³H, ¹⁴C y ¹⁸⁸Rh, marcadores fluorescentes, tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos en resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables por un detector de tomografía computarizada por emisión de fotón único ("SPECT") o un escáner de tomografía por emisión de positrones ("PET"), emisores de quimioluminiscencia, tales como luciferina y marcadores enzimáticos, tales como peroxidasa o fosfatasa. También pueden usarse emisores de radiación de corto alcance, tales como isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance, tales como una sonda transrectal. El anticuerpo puede marcarse con dichos agentes usando técnicas conocidas en la especialidad. Por ejemplo, véase Wensel y Mearns (1983) Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy, Elsevier, Nueva York, para técnicas relacionadas con el radiomarcaje de anticuerpos. Véase también, D. Colcher et al. Meth. Enzymol. 121: 802-816 (1986).

En el caso de un anticuerpo radiomarcado, el anticuerpo se administra al paciente, se localiza en el tumor portador del antígeno con el que reacciona el anticuerpo y se detecta u "obtienen imágenes" *in vivo* usando técnicas conocidas, tales como escaneo radionuclear usando, por ejemplo, una cámara gamma o tomografía de emisión o tomografía computarizada. Véase, por ejemplo, A.R. Bradwell et al., "Developments in Antibody Imaging", Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, R.W. Baldwin et al., (eds.), págs 65-85 (Academic Press 1985). Como alternativa, puede usarse un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, tal como el Pet VI indicado ubicado en el Brookhaven National Laboratory, donde el radiomarcador emite positrones (por ejemplo, ¹¹C, ¹⁸F, ¹⁵O y ¹³N).

La presente divulgación describe métodos para determinar la dosis, por ejemplo, la dosis de radiación, a la que se exponen diferentes tejidos cuando un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano, recibe la administración de una molécula de anticuerpo anti-GCC que está conjugada a un isótopo radiactivo. El método incluye: (i) administrar una molécula de anticuerpo anti-GCC como se describe en el presente documento, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC, que se marca con un isótopo radiactivo, a un sujeto; (ii) medir la cantidad de isótopo radiactivo ubicado en diferentes tejidos, por ejemplo, tumor o sangre, en diversos puntos de tiempo hasta que una parte o la totalidad del isótopo radiactivo se ha eliminado del organismo del sujeto; y (iii) calcular la dosis total de radiación recibida por cada tejido analizado. Las mediciones pueden tomarse en puntos de tiempo pautados, por ejemplo, el día 1, 2, 3, 5, 7 y 12, después de la administración (en el día 0) de la molécula de anticuerpo anti-GCC marcada radiactivamente al sujeto. La concentración de radioisótopo presente en un tejido dado, integrada a lo largo del tiempo y multiplicada por la actividad específica del radioisótopo puede usarse para calcular la dosis que recibe un tejido dado. La información farmacológica generada usando moléculas de anticuerpo anti-GCC marcadas con un isótopo radiactivo, por ejemplo, un emisor gamma, por ejemplo, ¹¹¹In, puede usarse para calcular la dosis esperada que recibiría el mismo tejido de un isótopo radiactivo que no puede medirse fácilmente, por ejemplo, un emisor beta, por ejemplo, ⁹⁰Y.

Secuencias de anticuerpo anti-GCC

Se generaron anticuerpos anti-GCC mediante varios métodos, como se analiza con más detalle en los ejemplos. En resumen, se generaron los anticuerpos monoclonales 3G1, 8F1 y 10B8 mediante tecnología de inmunización tradicional en ratones convencionales. Los anticuerpos monoclonales humanos 1D2, 5F9, 5H3, 6H8, 8C2 y 10C10 se generaron usando ratones transgénicos que generan anticuerpos IgG2 completamente humanos, utilizando la tecnología transgénica XENOMOUSE de Abgenix y se aislaron usando tecnología de hibridoma. Se generaron mAb Abx-012, mAb Abx-020, mAb Abx-106, mAb Abx-198, mAb Abx-221, mAb Abx-229, mAb Abx-338 y mAb Abx-393 humanos usando ratones transgénicos que generan anticuerpos IgG2 completamente humanos. Se aislaron anticuerpos individuales usando la tecnología SLAM de Abgenix. Estos se usaron para producir anticuerpos IgG1 completamente humanos. Se evaluó la especificidad de los anticuerpos contra GCC mediante ELISA y citometría de flujo (FCM). Se seleccionó un subconjunto de los anticuerpos generados para su caracterización adicional.

La tabla 1 a continuación resume para varios anticuerpos anti-GCC la denominación del anticuerpo, el inmunógeno usado para generar el anticuerpo, el animal usado, la fuente, la especie y los aislados de isotipo.

5

Tabla 1

<u>Ab</u>	<u>Inmunógeno</u>	<u>Animal</u>	<u>Fuente</u>	<u>Especie</u>	<u>Isotipo</u>
3G1	TOK107-hlg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
8F1	TOK107-hlg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
10B8	TOK107-hlg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
1D3	TOK107-hlg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
8E12	TOK107-hlg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
5F9	TOK107-hlg	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
1D2	TOK107-hlg	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
5H3	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
6H8	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
8C2	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
10C10	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
10D3	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
1C9	Células CHO-GC-C n.º 27	XenoMouse	Hibridoma	Ser humano	IgG2,k
229	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
012	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
221	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
020	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
338	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
106	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
198	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k
393	TOK107-hlg	XenoMouse	SLAM	Ser humano	IgG1,k

Se determinaron las secuencias de las regiones variables de cadena ligera y pesada. La tabla 2 a continuación es un resumen de las SEQ ID NO para las regiones variables de varios anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para las regiones variables de cada una de las cadenas pesadas y ligeras para los anticuerpos anti-GCC murinos y humanos se muestran en las tablas 3 y 4, respectivamente.

10

Las secuencias de aminoácidos y de ácido nucleico para cada una de las CDR de las cadenas pesadas y ligeras para anticuerpos anti-GCC se muestran en las tablas 5 y 6, respectivamente.

15

Por ejemplo, la tabla 3, fila 9 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos codificada de la región variable de cadena pesada madura del mAb 5F9 (SEQ ID NO: 18); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena pesada madura del mAb 5F9 (SEQ ID NO:17) se representa en la tabla 4, fila 9. Las secuencias de aminoácidos codificadas de las CDR de cadena pesada del mAb 5F9, (CDR) 1 (SEQ ID NO: 106), CDR2 (SEQ ID NO: 108) y CDR3 (SEQ ID NO: 110) se representan en la tabla 5, filas 25-27, respectivamente; y las secuencias de ácido nucleico de las CDR de cadena pesada del mAb 5F9, CDR1 (SEQ ID NO: 105), CDR2 (SEQ ID NO: 107) y CDR3 (SEQ ID NO: 109) se muestran en la tabla 6, filas 25-27, respectivamente.

20

La tabla 3, fila 10 es una ilustración de la secuencia de aminoácidos codificada de la región variable de cadena ligera

5 madura del mAb 5F9 (SEQ ID NO: 20); y la secuencia de ácido nucleico que codifica la región variable de cadena ligera kappa madura del mAb 5F9 (SEQ ID NO:19) se representa en la tabla 4, fila 10. Las secuencias de aminoácidos codificadas de las CDR de cadena ligera del mAb 5F9, (CDR) 1 (SEQ ID NO: 112), CDR2 (SEQ ID NO: 114) y CDR3 (SEQ ID NO: 116) se representan en la tabla 5, filas 28-30, respectivamente; y las secuencias de ácido nucleico de las CDR de cadena ligera del mAb 5F9, CDR1 (SEQ ID NO: 111), CDR2 (SEQ ID NO: 113) y CDR3 (SEQ ID NO: 115) se muestran en la tabla 6, filas 28-30, respectivamente.

10 La secuenciación de las CDR permitió la determinación de la abundancia de restos que podrían servir como sitios de conjugación a toxinas.

15 Una cisteína libre no emparejada en la región de unión a antígeno puede ser un sitio para conjugación con auristatina y una lisina puede ser un sitio para conjugación con maitansina. La conjugación de toxinas a un aminoácido de la CDR podría suscitar dudas acerca de la alteración de la afinidad de unión del anticuerpo a GCC. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las CDR carecen de un aminoácido que podría conjugarse a un agente terapéutico.

Tabla 2. Resumen de las SEQ ID NO para las regiones variables de anticuerpos monoclonales.

mAb	Cadena de IgG	SEC ID de AN	SEQ ID de AA
3G1	Cadena pesada	1	2
	Cadena ligera	3	4
8E12	Cadena pesada	5	6
	Cadena ligera	7	8
8F1	Cadena pesada	9	10
	Cadena ligera	11	12
1D3	Cadena pesada	13	14
	Cadena ligera	15	16
5F9	Cadena pesada	17	18
	Cadena ligera	19	20
5H3	Cadena pesada	21	22
	Cadena ligera	23	24
6H8	Cadena pesada	25	26
	Cadena ligera	27	28
8C2	Cadena pesada	29	30
	Cadena ligera	31	32
10C10	Cadena pesada	33	34
	Cadena ligera	35	36

ES 2 788 457 T3

(continuación)

mAb	Cadena de IgG	SEC ID de AN	SEQ ID de AA
	Cadena ligera	288	289
Abx-012	Cadena pesada	238	239
	Cadena ligera	240	241
Abx-020	Cadena pesada	37	38
	Cadena ligera	39	40
Abx-106	Cadena pesada	242	243
	Cadena ligera	244	245
Abx-198	Cadena pesada	41	42
	Cadena ligera	43	44
Abx-221	Cadena pesada	246	247
	Cadena ligera	248	249
Abx-229	Cadena pesada	45	46
	Cadena ligera	47	48
Abx-338	Cadena pesada	49	50
	Cadena ligera	51	52
Abx-393	Cadena pesada	53	54
	Cadena ligera	55	56

Tabla 3: Secuencia de aminoácidos de la región variable del mAb
Secuencia de aminoácidos

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
1	3G1 Cadena pesada	2	QVQLKESGPGLVAPSSQSLTCTVSGFSLR <u>NAISWVRQP</u> PGKLEWLVGIWITGGGTNYNSALKRSLR <u>SIRKENS</u> KSQVF LKMNSLQTEDTARYFCAR <u>SGYDGFYWGQGT</u> LVTVSA
2	3G1 Cadena ligera	4	QIVLTQPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVNY <u>MHWYQK</u> SGTSPKRWYDT <u>SKLASGVPARFSGSG</u> TSYSLTITSM <u>E</u> AEDAA <u>TYCQQW</u> SGNPYTFGGG <u>TKLEIK</u>
3	8E12 Cadena pesada	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVK QRPGGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKA <u>TLTADKSSS</u> TAYMQLSSTSEDSAVYFCAR <u>WDAYWGQGT</u> LVTVS
4	8E12 Cadena ligera	8	DVVMVTQTPLSLVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVYYC <u>LQGTYYPYTFGGG</u> TKLEIK
5	8F1 Cadena pesada	10	QVQLQQPGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYWYMWV KQRPQQGLEWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKA <u>TLTVDKSS</u> STAYMQLSSTSEDSAVYYC <u>THALAYWGQGT</u> LVTVS
6	8F1 Cadena ligera	12	DVVLVTQPLTLTITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLSWL LQRPQQSPKRLLYLSQLDSGV <u>PDRFTGSGSG</u> TDFTLKIS RVEAEDLGVYYC <u>VQGT</u> HLFTFGSGG <u>TKLEIK</u>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
7	1D3	Cadena pesada	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWV KQRPQGQGLEWIGKIGPRSGSYINEKFKGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWQGGLLVTVSA
8	1D3	Cadena ligera	16	DVVMQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLN WLQRPQGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTL KISRVEAEDLGVVYCLQGTYYPYTFGGGKLEIK
9	5F9	Cadena pesada	18	QVQLQWGWGAGLLKLPSETLSLTCAVFGGFSFGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQF ALKLSSVTAADTAVVYCARERGYTYGNFDHWGQGTLV TVSS
10	5F9	Cadena ligera	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYCQQYKTPWPRTFGGQTNVEIK
11	5H3	Cadena pesada	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIR QSPGKGLEWVSYITTSQNTIYADS VKGRFTISRDNAKN SLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWIFYGMDVWVGQGT TVTIVSS

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
12	5H3	Cadena ligera	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHNDGKTYLY WYLQKPGQPPQLLIYEVSNRFGVDPDRFSSSGSXTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK
13	6H8	Cadena pesada	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIWIYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGT L VTVSS
14	6H8	Cadena ligera	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFGVDPDRFSGGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQPTFGQGTREIK
15	8C2	Cadena pesada	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCV ASGFTFSSYGMHWVR QAPGKGLEWVGAIWYDGSNKYYAASVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGT L TVSS
16	8C2	Cadena ligera	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFGVDPDRFSGGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQPTFGQGTREIK

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
17	10C10	Cadena pesada	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLAAASGFTSSYGMHWVR QAPGKGLEWVAIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGL VTVSS
18	10C10	Cadena ligera	36	DIVMTQPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTYLS WLQORPGQPPRLLYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLK ISRVEAEDVGVYYCMQATQFPFFGQGRLEIK
35	10D3	Cadena pesada	287	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVFGGFSFGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKS VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYG NFDHWGQGLVTVSS
36	10D3	Cadena ligera	289	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQ KPGQAPRLLYGASSRATGTPDRFSGSGGTDFLTISRLE PEDFAVYFCQQYERSFTFGPGTKVD
19	Abx-012	Cadena pesada	239	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVSVSDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGLVTVSS

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
20	Abx-012	Cadena ligera	241	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFRFGSGGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSLTFFGGGKVEIK
21	Abx-020	Cadena pesada	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWISYITSSGSIYYASVKGRFTISRDNKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDVDFGWFVGFVDFYWGQGT LVTVSS
22	Abx-020	Cadena ligera	40	DIVMTQPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFGVFNRFSGSGGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGGGKVEIK
23	Abx-106	Cadena pesada	243	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRTVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGTLLVTVSS
24	Abx-106	Cadena ligera	245	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFRFGSGGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPMCSFGGQTKLEIK

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
25	Abx-198	Cadena pesada	42	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSYAMSWVR QAPGKGLDWVSDISGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLV TVSS
26	Abx-198	Cadena ligera	44	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRARQRVDSRYLA WYQQ KPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGGTDFL TISRLE PEFAVYYCQYQYSSPLTFGGGKVEIK
27	Abx-221	Cadena pesada	247	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAM NWVR QAPGKLEWVSGISGSGSTYYADSVKGRFTISR DN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDY WGGGT LVTVSS
28	Abx-221	Cadena ligera	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSL AWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGGTFTL TISLQS EDVAVYYCQYNNWMCSEFGGKLEIK
29	Abx-229	Cadena pesada	46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAM NWVR QAPGKLEWVSGISGSGRTYYADSVKGRFTISR DN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSPFDY WGGGT LVTVSS

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
30	Abx-229	Cadena ligera	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGGTEFTLTISLQS EDFAVYYCHQYSNWMCFSFGGQTKLEIK
31	Abx-338	Cadena pesada	50	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSYYSWIRQP AGKGLEWIGRIYISGRITTFNPSLKRVTISVDTSKNQFSLK LSSVTAADTAVYFCARDRYGYLDYWGQGTLVTVSS
32	Abx-338	Cadena ligera	52	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQ KPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSPSTFGQGRLEIK
33	Abx-393	Cadena pesada	54	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSIKSYYSWIRQ PPKGLEWIGYIYSGSTNYNLSLKRVTISRDTSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGTLVTVSS
34	Abx-393	Cadena ligera	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVITTCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGGTEFTLTISLQPE DSATYYCLQHNSFPPSTFGGQTKVEIK

Tabla 4: Secuencias de ácido nucleico de la región variable del mAb

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
1	3G1	Cadena pesada	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACCTGTC TCTGGGTTCTCATTAAGCAGAAAATGCTATAAGCTGG GTTCCGCCAGCCACCCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTT GGAGTAATATGGACTGGTGGAGGCCACAAAATTATAAT TCAGCTCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAG AACTCCAAGAGTCAAGTTTTCTTAAAAAATGAACAGT CTACAAACTGAAGACACACAGCCAGGTACTTCTGTGCC AGAAAGTGGTTACGACGGGTTTGATTACTGGGGGCCAA GGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
2	3G1	Cadena ligera	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTG CATCTCCAGGGGAGAAAGGTCACCATGACCTGCAGTG CCAGCTCAAGTGTAATTAACATGCACCTGGTACCAGC AGAAAGTCAGGCACCTCCCCAAAAGATGGATTTATG ACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCCTGCTCGCTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAC AATCACCCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA TTACTGCCAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTT CGGAGGGGGGACCACAACTGGAAAATAAAA

(continuación)

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
3	Cadena pesada	5	<p>CAGGTCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTG AAGCCTGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACTGACTACTATATAACTGGG TGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTG GAAAGATTGGTCTCGAAGTGGTAATACTTACTACA ATGAGAAAGTTCAAAGGCCAAGGCCACACTGACTGCA GACAAATCGTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGC AGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTG CAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAAGGGACTCTGG TCACTGICTCT</p>
4	Cadena ligera	7	<p>GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCCG TTACCAITGGACAACACAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTGAAITGGTTACAACAGAGGCCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTGCAAGGTAC ATATTTACCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAG</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
5	8F1	Cadena pesada	9	<p>CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAAACTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGCAAGATGTCCTGTAAAGGCT TCTGGCTATAATTTTCAACCGGCTACTGGATGTAAGGCTGGG TGAAAGCAGAGGGCCTGGCCAAAGGCCCTTGAGTGGATTG GAAAGGATTCATCCTTCTGTAGATAACTAATACTAACA ATCAAAAAGTTCAAAGGGCAAAGGCCACATTGACTGTAG ACAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCA GCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTAC CCATGCCCTTGCTTACTGGGGCCAAAGGGACTCTGGT CACTGTCTCT</p>
6	8F1	Cadena ligera	11	<p>GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTTGTCTCGA TTACCATTGGACAACCAAGCCTCTATCTCTTTGCCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTA TTTGAGTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCC AAAGGCCCTAATCTATCTGGGTCTCAACTGGACTCT GGAGTCCCIGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGA ACAGATTTTACACTGAAAGATCAGCAGAGTGGAGGCT GAGGATTTGGGAGTGTATTACTGCGTGCAGAGGTACA CATTATTACAGTTGCGCTCGGGGACAAAAGTTGGAA ATAAAA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
7	1D3	Cadena pesada	13	<p>CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTG AAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCCTGCAAGGCT TCTGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGG GTGAAGCAGAGGCCCTGGACAGGGCCCTTGAGTGGATT GGAAAAGATTGGTCCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTAC AATGAGAAAGTTCAAGGGCAAAGGCCACACTGACTGC AGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAG CAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGT GCAAGATGGGATGCTTACTGGGGCCAAAGGGACTCTG GTCACCTGTCCTCTGCA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
8	1D3	Cadena ligera	15	<p>GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGCTTTGTCCGG TTACCATTGGACAACCAAGCCTCTATCTCTTGCAAGTC AAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATA TTTGAATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCC AAAGCACCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCC TGGCATCCCTGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGA AACAGATTTTACACTTAAAAATCAGCAGAGTGGAGGC TGAAGATTTGGGAGTTTATTACTGCTTTGCAAGGTAC ATATTATCCGTACACGTTCCGGAGGGGGACCAAGCT GGAAATAAAA</p>
9	5F9	Cadena pesada	17	<p>CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCCGAGGACTGTTG AAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGGCTGTCT TTGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGAT CCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTG GGGAAATCAATCATCTGTGGAAACACCAACGACAAC CCGTCCCCTCAAGAGTCGAGTCAACCATATCAGTAGAC ACGTCCAAGAACCAAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCT GTGACCCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGGG AGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCAC TGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
10	5F9	Cadena ligera	19	GAAATAGTGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAAAACCTTAGCCTGGTAT CAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCCAGCC AGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACT CTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCA GTTTATTACTGTACAGCAGTATAAAACCTGGCCCTCGG ACGTTCCGCCAAGGGACCAACGTGGAAAATCAAA
11	5H3	Cadena pesada	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTCCAGTACTGCTACATGAGCTGG ATCCGCCAGTCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTT TCATACATTACTACTAGTGGTAATACCAITTTACTACG CAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGG ACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGAGAGACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTCT GGGGCCAAGGGACCAACGGTCAACCGTCTCCTCA

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
12	5H3	Cadena ligera	23	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGT CTAGTCAGAGCCCTCCTGCATAAATGATGGAAGACCT ATTTGTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCCTC CACAACTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCCGGTTCTC TGGAGTCCCAGATAGGTTTCAGTAGCAGCGGGGTCNNG GACAGATTTCACACTGAAAAATCAGCCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAAGTAT ACAGCTTCCTCGGACGTTTCGGCCAAAGGGACCAAGGT GGAAATCAAA</p>
13	6H8	Cadena pesada	25	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAAGTAAATAACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGA GACAAATCCAAGAACACCGCTGTATCTGCAAAATGAAC AGCCTGAGAGCCCGAGGACACCGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTTGACTATTGG GGCCAGGGAAACCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
14	6H8	Cadena ligera	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGA GATAAA
15	8C2	Cadena pesada	29	caggTgcagctggggagctggggggaggcgtggcagccctggggaggTCCCT GAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCAACCTTCAGT AGCTATGGCATGCACCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGAT GGAAATAATAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGC CGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACG CTGTATCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGAC ACGGCTGTATTTTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGC TCGTATTTTGACTACTGGGGCCAGGGAAACCCCTGGTC ACCGTCTCCTCA

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
16	8C2	Cadena ligera	31	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTTGGACAGCCGGCCCTCCATCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAACACACCTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCT GGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTCACACTGAAAAATCAGCAGGGTGGGAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTAC GCAATTTCCAACTTCGGCCAAAGGGACACCGACTGGA GATTAAA</p>
17	10C10	Cadena pesada	33	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACTTCAGTAGCTATGGCATGCACCTGG GTCCGCCAGGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTG GCAGCTATATGGTATGATGGAAAGTAAATAACTAT GCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCAACCATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACCGCTGTATCTGCAAAATGAAC AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGT GCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGG GGCCAGGGAACCCTGGTCAACCCTCTCCTCA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
18	10C10	Cadena ligera	35	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTG TCACCCCTTGGACACAGCCGGCCCTCTTCTCCTGCAGGTC TAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTA CTTGAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCC AAGACTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCT GGGGTCCCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGG GACAGATTTCCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAAGC TGAGGATGTCGGGGTTTATTACTGCATGCCAAGCTAC ACAATTTCCAACCTTCGGCCCAAGGGACACCGACTGGA GATTAAA</p>

(continuación)

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
35	10D3	286	<p>CAGGTGCA</p> <p>GCTACAGCAGTGGGGCCAGGACTGTTGAAGCCCTTC</p> <p>GGAGACCCCTGTCCC</p> <p>TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTA</p> <p>CTACTGGAGCTGG</p> <p>ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGATT</p> <p>GGGAAAATCAATCA</p> <p>TCGTGGAAACACCAACGACAACCCCGTCCCTCAAGAG</p> <p>TCGAGTCACCATAT</p> <p>CAGTAGACACGTCCAAGAACCCAGTTCGCCCTGAAGC</p> <p>TGAGTTCTGTGACC</p> <p>GCCGGGACACGGCTGTTTATTACTGTGGGAGAGAA</p> <p>CGTGGATACACCTA</p> <p>TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAAACCCCTGGT</p> <p>CACCGTCTCCTCA</p>

(continuación)

36	mAb 10D3	Cadena de IgG Cadena ligera	SEQ ID NO: 288	Secuencia de ácido nucleico
<p>GAAATTGTGTTGACGGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCCTT TGTCCTCAGGGGA</p> <p>AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGT TAGCAGCAGGTACT</p> <p>TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCA GGCTCCTCATCTAT</p> <p>GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCACAGACAGG TTCAGTGGCAGTGG</p> <p>GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACT GGAGCCTGAAGATT</p> <p>TTGCAGTGTATTTCTGTGCAGCAGTATGAAAGGTCATT CACTTTCGGCCCT</p> <p>GGGACCAAAGTGGAT</p>				

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
19	Abx-012	Cadena pesada	238	<p>CAGGTGCAGTTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACGTGTCT CTGGTGC</p> <p>CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCGCCGGGAAGGGACTGGAAATGGATTGGGGCGTAT CTATATCA</p> <p>GTGGGAGGACCAGCTACAAACCCCTCCCTCAAAGAGTC GAGTCAACCCTGTGAGTACAGACACCGTCCCAAGAACCCAGT TCTCCCTG</p> <p>AAGCTGAGCTCTGTGACCCCGCGGACACGGCCCGTG TATTACTGTCCGAGAGATCGGGTAACTGGGTACTTT GACTACTG</p> <p>GGGCCAGGGAAACCCCTGGTCAACCGTCTCCCTCAG</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
20	Abx-012	Cadena ligera	240	<p>GAATTGTGTTGAGCGCAGTCTCCAGGCCACCCCTGTCTT TGTCCTCCAGGGGAAAGAGGCCACCCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGG TGCATCCA GCAGGCCCGCTGGCATCCAGACAGGTTCAAGTGGA GTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATG GTAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGG AGATCAA AC</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
21	Abx-020	Cadena pesada	37	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTCAGTGACTACTACATGAGCTGG ATCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT TCATACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACT CAGCCTCTGTGAAGGGCCGATTCCACCATCTCCAGGG ACAACGCCAAGAACACTCACTGTATCTGCAAAATGAACA GCCTGAGAGCCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG CGAGAGATTTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCT CG</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
22	Abx-020	Cadena ligera	39	<p>GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCG TCACCCCTGGACAGCCGGCCCTCCATCTCCTGTAAGTC TAGTCAGAGCCCTCCTGCATAGTGATGGAAAAGACCTA TTTGTAITGGTACCCTGCAGAAAGCCAGGCCAGCCTCC ACAGCTCCTGATCTATGAAGTTTCCAAACCCGGTTCTCT GGAGTGCCAAAATAGGTTTCAGTGGCAGCGGGTCAAG GACAGATTTCACTGAAAAATCAGCCGGGTGGAGGC TGAGGATGTTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTAT ACAACTTACGTGGACGTTTCGGCCAAAGGGACCAAGGT GGAAAATCAAA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
23	Abx-106	Cadena pesada	242	<p>CAGGTGCAGTTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTG AAGCC TTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACCTGTCT CTGGTGC</p> <p>CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCA GCCCCCGGGAAGGGACTGGAAATGGATTGGGGCGTAT CTATATCA</p> <p>GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAAGAGTC GAGTCAACCGTGTGAGTAGACACGTCACAAGAACCCAGT TCTCCCTG</p> <p>AAGCTGAGCTCTGTGACCCGGGGACACGGCCCGTG TATTACTGTGGAGAGATCGGCTAACCTGGGTACTTT GACTACTG</p> <p>GGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCCTCAGC</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
24	Abx-106	Cadena ligera	244	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGTCTT TGCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCA</p> <p>GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCCAGGCTCCTCATCTATGG TACATCCA</p> <p>GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAAGTGGCA GTGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCA GACTGGAG</p> <p>CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTACAGCAGTAT GGTAGCTCACCCATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACC AAGCTGGA</p> <p>GATCAAACG</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
25	Abx-198	Cadena pesada	41	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGG GTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTC TCAGATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTAC GCAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCAATCTCCAGA GACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCAC AGCCTGAGCGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGT GCGAAACGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTCTGG GGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA</p>
26	Abx-198	Cadena ligera	43	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCCACCCTGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGGCAGCCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCCCTGGT ACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCAATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTG CAGTGTATTACTGTCAAGCAGTATGGTAGCTCACCCG TCACCTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
27	Abx-221	Cadena pesada	246	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCA GGCTCCAGGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTAT TAGTGGTA GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGG GCCGGTTCAACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACA CGCTGTAT CTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCCGAGGACACGGC CGTATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTTGGAG TGGTCCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTC CTCAGC</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
28	Abx-221	Cadena ligera	248	<p>GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCT GTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGG GCCAGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAA ACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGTGC ATCCACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGAAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCC TGCAGTCT GAAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAT AACTGGATGTCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTG GAGATCAA ACG</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
29	Abx-229	Cadena pesada	45	<p>GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTA CAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCC TCTGGATTCACTTTAGCCCGCTATGCCATGAACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTCT CAGGTATTAGTGGGAGTGGTAGGACATACTACG CAGACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACAACACTATACTGCAAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTATAATTACTGTG CGAAAGATCGCGATTTTGGAGTGGTCCATTTGACT ACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>
30	Abx-229	Cadena ligera	47	<p>GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCCTGTCT GTGTCTCAGGGGAGAGAGCCACCCCTCTCCTGCAGG GCCAGTCAGAGTGTAGTAGAACTTAGCCCTGGTAC CAGCAGAAAACCTGGCCAGGCTCCCAAGGCTCCTCATC TATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAAGCC AGGTTACAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAAATCACT CTCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAAGATTTTGCA GTTTAATTACTGTCAACAGTATAGTAACTGGATGTGCA GTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
31	Abx-338	Cadena pesada	49	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACCTGTCT CTGGTGGCTCCATCAGAAAGTTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCGGGGAAGGACTGGAGTGGATTG GACGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACC CCTCCCTCAAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACA CGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAAGCTGAGCTCTG TGACCGCCCGGACACGGCCCGTGTATTTCTGTGCGA GAGATAGATATTAATGGCTACCTTGACTACTGGGGGCC AGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCA</p>
32	Abx-338	Cadena ligera	51	<p>GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCCACCCGTCTT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACTTAGCCCTGGT ACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTG CAGTGTATTACTGTACGAGTATGGTAGTTCACCGA GCACCTTCGGCCAAGGGACACCGACTGGAGATTAAA</p>

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
33	Abx-393	Cadena pesada	53	<p>CAGGTGCAGCTGCAGGAGTGGGGCCAGGACTGGTG AAGCCTTGGGAGACCCCTGTCCCTCACCTGCACGTGTCT CTGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGA TCCGGCAGCCCCCAGGGAAAGGGACTGGAGTGGATTG GGTATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACC TCTCCCTCAAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACA CGTCCAAGAATCAGGTCTCCCTG</p> <p>AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTG TATTATTGTGCGGGGATATGGGCTTTGACTACTGG GGCCAGGGAACCCCTGGTCAACCCTCTCCCTCA</p>
34	Abx-393	Cadena ligera	55	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCCTCCCTGTCTG CATCTATAGGAGACAGAGTCAACCATCATTGCCCGGG CAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATC AGCTGAAACCGGGGAAAGCCCTAAGCGCCTGATCT ATTCTGCATCCAAGTTTGCAAAAGTGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGAATTCACCTC TCACAAATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAA CTTATTACTGTCTACAGCATAAATAGTTTCCCTCCGAC GTTCCGGCCAAAGGGACCAAGGTGGAAAATCAAA</p>

Tabla 5: Secuencias de aminoácidos de las CDR

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
1	3G1	CDR1 de VH	58	RNAIS
2	3G1	CDR2 de VH	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	CDR3 de VH	62	SGYDGFYD
4	3G1	CDR1 de VL	64	SASSSVNYMH
5	3G1	CDR2 de VL	66	DTSKLAS
6	3G1	CDR3 de VL	68	QQWSGNPYT
7	8E12	CDR1 de VH	70	DYYIN
8	8E12	CDR2 de VH	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	CDR3 de VH	74	WDAY
10	8E12	CDR1 de VL	76	KSSQSLLYSNGKTYLN
11	8E12	CDR2 de VL	78	QVSKLDP
12	8E12	CDR3 de VL	80	LQGTYYPYT
13	8F1	CDR1 de VH	82	GYWMY
14	8F1	CDR2 de VH	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	8F1	CDR3 de VH	86	ALAY
16	8F1	CDR1 de VL	88	KSSQSLL YSNGKTYLS
17	8F1	CDR2 de VL	90	LVSQLDS
18	8F1	CDR3 de VL	92	VQGTHLFT
19	1D3	CDR1 de VH	94	DYYIN
20	1D3	CDR2 de VH	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	1D3	CDR3 de VH	98	WDAY
22	1D3	CDR1 de VL	100	KSSQSLL YSNGKTYL
23	1D3	CDR2 de VL	102	QVSKLDP
24	1D3	CDR3 de VL	104	LQGTYYPYT
25	5F9	CDR1 de VH	106	GYWWS
26	5F9	CDR2 de VH	108	EINHRGNTNDNPSLKS
27	5F9	CDR3 de VH	110	ERGYTYGNFDH
28	5F9	CDR1 de VL	112	RASQSVSRNLA
29	5F9	CDR2 de VL	114	GASTRAT
30	5F9	CDR3 de VL	116	QQYKTPRT

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
31	5H3	CDR1 de VH	118	DCYMS
32	5H3	CDR2 de VH	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	5H3	CDR3 de VH	122	DWGWFYGM DV
34	5H3	CDR1 de VL	124	KSSQSL LHNDGKTYLY
35	5H3	CDR2 de VL	126	EVS NRFS
36	5H3	CDR3 de VL	128	MQSIQLPRT
37	6H8	CDR1 de VH	130	SYGMH
38	6H8	CDR2 de VH	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	6H8	CDR3 de VH	134	GRSSSYFDY
40	6H8	CDR1 de VL	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	6H8	CDR2 de VL	138	KTSNRFS
42	6H8	CDR3 de VL	140	MQATQFPT
43	8C2	CDR1 de VH	142	SYGMH
44	8C2	CDR2 de VH	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	8C2	CDR3 de VH	146	GRSSSYFDY
46	8C2	CDR1 de VL	148	RSSQSLVHSDGNTYLS
47	8C2	CDR2 de VL	150	KTSNRFS
48	8C2	CDR3 de VL	152	MQATQFPT
49	10C10	CDR1 de VH	154	SYGMH
50	10C10	CDR2 de VH	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	10C10	CDR3 de VH	158	GRSSSYFDY
52	10C10	CDR1 de VL	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	10C10	CDR2 de VL	162	KISNRFS
54	10C10	CDR3 de VL	164	MQATQFPT
103	10D3	CDR1 de VH	291	GYYS
104	10D3	CDR2 de VH	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	10D3	CDR3 de VH	295	ERGYTYGNFDH
106	10D3	CDR1 de VL	297	RASQSVSSRYLA
107	10D3	CDR2 de VL	299	GASSRAT
108	10D3	CDR3 de VL	301	QQYERSFT

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
55	Abx-012	CDR1 de VH	251	HYYWS
56	Abx-012	CDR2 de VH	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	Abx-012	CDR3 de VH	255	DRLTGYFDY
58	Abx-012	CDR1 de VL	257	RASQSVSSSYLA
59	Abx-012	CDR2 de VL	259	GASSRAA
60	Abx-012	CDR3 de VL	261	QQYGSSLT
61	Abx-020	CDR1 de VH	166	DYYMS
62	Abx-020	CDR2 de VH	168	YITSSGSTIYYSASVKG
63	Abx-020	CDR3 de VH	170	DFSGWFGVHFDY
64	Abx-020	CDR1 de VL	172	KSSQSLHSDGKTYLY
65	Abx-020	CDR2 de VL	174	EVSNRFS
66	Abx-020	CDR3 de VL	176	MQSIQLTWT
67	Abx-0106	CDR1 de VH	263	HYYWS
68	Abx-106	CDR2 de VH	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	Abx-106	CDR3 de VH	267	DRLTGYFDY
70	Abx-106	CDR1 de VL	269	RASQSVSSSYLA
71	Abx-106	CDR2 de VL	271	GTSSRAT
72	Abx-106	CDR3 de VL	273	QQYGSSPMCS
73	Abx-198	CDR1 de VH	178	SYAMS
74	Abx-198	CDR2 de VH	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	Abx-198	CDR3 de VH	182	RRWQGYFDL
76	Abx-198	CDR1 de VL	184	RARQRVDSRYLA
77	Abx-198	CDR2 de VL	186	GASSRAT
78	Abx-198	CDR3 de VL	188	QQYGSSPLT
79	Abx-221	CDR1 de VH	275	RYAMN
80	Abx-221	CDR2 de VH	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	Abx-221	CDR3 de VH	279	DRDFWSGPFYD
82	Abx-221	CDR1 de VL	281	RASQSVSRSLA
83	Abx-221	CDR2 de VL	283	GASTRAT
84	Abx-221	CDR3 de VL	285	QQYNNWMCS

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
85	Abx-229	CDR1 de VH	190	RYAMN
86	Abx-229	CDR2 de VH	192	GISGSGGRTYYADSVKG
87	Abx-229	CDR3 de VH	194	DRDFWSGPFDY
88	Abx-229	CDR1 de VL	196	RASQSVSRNLA
89	Abx-229	CDR2 de VL	198	GASTRAT
90	Abx-229	CDR3 de VL	200	HQYSNWMCS
91	Abx-338	CDR1 de VH	202	SYIWS
92	Abx-338	CDR2 de VH	204	RIYISGRITTFNPSLKS
93	Abx-338	CDR3 de VH	206	DRYYGYLDY
94	Abx-338	CDR1 de VL	208	RASQSVSRSYLA
95	Abx-338	CDR2 de VL	210	DASSRAT
96	Abx-338	CDR3 de VL	212	QQYGSSPST
97	Abx-393	CDR1 de VH	214	HYYWS
98	Abx-393	CDR2 de VH	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	Abx-393	CDR3 de VH	218	GMGFDY
100	Abx-393	CDR1 de VL	220	RASQAIRNDLG
101	Abx-393	CDR2 de VL	222	SASSLQS
102	Abx-393	CDR3 de VL	224	LQHNSFPPT
109	consenso	CDR1 de VH	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	consenso	CDR2 de VH	303	x-l-x-x-SG-[x o ninguno]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	consenso	CDR3 de VH	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	consenso	CDR1 de VL	305	R/K-A/S-SQS-V/I-S/I-[5-9x]
113	consenso	CDR2 de VL	306	x-x-S-x-R-x-x
114	consenso	CDR3 de VL	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

Tabla 6. Secuencias de ácido nucleico de las CDR

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
1	3G1	CDR1 de VH	57	AGAAATGCTATAAGC
2	3G1	CDR2 de VH	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTAT AATTCAGCTCTCAAATCC
3	3G1	CDR3 de VH	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
4	3G1	CDR1 de VL	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTACATGCAC
5	3G1	CDR2 de VL	65	GACACATCCAACTGGCTTCT
6	3G1	CDR3 de VL	67	<u>CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACG</u>
7	8E12	CDR1 de VH	69	GACTACTATATAAAC
8	8E12	CDR2 de VH	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
9	8E12	CDR3 de VH	73	TGGGATGCTTAC
10	8E12	CDR1 de VL	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
11	8E12	CDR2 de VL	77	CAGGTGTCCAACTGGACCCT
12	8E12	CDR3 de VL	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
13	8F1	CDR1 de VH	81	<u>GGCTACTGGATGTAC</u>
14	8F1	CDR2 de VH	83	<u>AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACT</u> <u>ACAATCAAAAAGTTCAAGGGC</u>
15	8F1	CDR3 de VH	85	<u>GCCCTTGCTTAC</u>
16	8F1	CDR1 de VL	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAAACCTATTTGAGT
17	8F1	CDR2 de VL	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	8F1	CDR3 de VL	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG
19	1D3	CDR1 de VH	93	GACTACTATATAAAC
20	1D3	CDR2 de VH	95	AAGATTGGTCCTAGAAAGTGGTAGTACTTACT ACAATGAGAAGTTCAAGGGC
21	1D3	CDR3 de VH	97	TGGGATGCTTAC
22	1D3	CDR1 de VL	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATAGTAATG GAAAGACATATTTGAAT
23	1D3	CDR2 de VL	101	CAGGTGTCCAACTGGACCCT
24	1D3	CDR3 de VL	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACACG
25	5F9	CDR1 de VH	105	GGTACTACTGGAGC
26	5F9	CDR2 de VH	107	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
27	5F9	CDR3 de VH	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
28	5F9	CDR1 de VL	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCC
29	5F9	CDR2 de VL	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	5F9	CDR3 de VL	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACG
31	5H3	CDR1 de VH	117	GACTGCTACATGAGC
32	5H3	CDR2 de VH	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACT ACGCAGACTCTGTGAAGGGC
33	5H3	CDR3 de VH	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATGGACGTC
34	5H3	CDR1 de VL	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATG GAAAGACCTATTTG
35	5H3	CDR2 de VL	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	5H3	CDR3 de VL	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGGACG
37	6H8	CDR1 de VH	129	AGCTATGGCATGCAC
38	6H8	CDR2 de VH	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
39	6H8	CDR3 de VH	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
40	6H8	CDR1 de VL	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
41	6H8	CDR2 de VL	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	6H8	CDR3 de VL	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC
43	8C2	CDR1 de VH	141	AGCTATGGCATGCAC
44	8C2	CDR2 de VH	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGCCTCCGTGAAGGGC
45	8C2	CDR3 de VH	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGACTAC
46	8C2	CDR1 de VL	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACCTACTTGAGT
47	8C2	CDR2 de VL	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	8C2	CDR3 de VL	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
49	10C10	CDR1 de VH	153	AGCTATGGCATGCAC
50	10C10	CDR2 de VH	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACT ATGCAGACTCCGTGAAGGGC
51	10C10	CDR3 de VH	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGACTAT
52	10C10	CDR1 de VL	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATG GAAACACGTACTIONTGTGAGT
53	10C10	CDR2 de VL	161	AAGATTTCTAACCGTTCTCT
54	10C10	CDR3 de VL	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC
103	10D3	CDR1 de VH	290	GGTACTACTGGAGC
104	10D3	CDR2 de VH	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC AACCCGTCCCTCAAG
105	10D3	CDR3 de VH	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACC AC
106	10D3	CDR1 de VL	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGGTAC TTAGCCT
107	10D3	CDR2 de VL	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG
108	10D3	CDR3 de VL	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACTT
55	Abx-012	CDR1 de VH	250	CATTACTACTGGAGC
56	Abx-012	CDR2 de VH	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
57	Abx-012	CDR3 de VH	254	GATCGGCTAACTGGTACTTTGACTAC
58	Abx-012	CDR1 de VL	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
59	Abx-012	CDR2 de VL	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	Abx-012	CDR3 de VL	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	Abx-020	CDR1 de VH	165	GACTACTACATGAGC
62	Abx-020	CDR2 de VH	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACT ACTCAGCCTCTGTGAAGGGC

ES 2 788 457 T3

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
63	Abx-020	CDR3 de VH	169	GATTCAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTG ACTAC
64	Abx-020	CDR1 de VL	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATG GAAAGACCTATTTGTAT
65	Abx-020	CDR2 de VL	173	GAAGTTCCAACCGTTCTCT
66	Abx-020	CDR3 de VL	175	ATGCAAAGTATACAACCTACGTGGACG
67	Abx-106	CDR1 de VH	262	CATTACTACTGGAGC
68	Abx-106	CDR2 de VH	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACCAGCTACA ACCCCTCCCTCAAGAGT
69	Abx-106	CDR3 de VH	266	GATCGGCTAACTGGTACTTTGACTAC
70	Abx-106	CDR1 de VL	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTAC TTAGCC
71	Abx-106	CDR2 de VL	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	Abx-106	CDR3 de VL	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATGTGCAGT
73	Abx-198	CDR1 de VH	177	AGCTATGCCATGAGC
74	Abx-198	CDR2 de VH	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
75	Abx-198	CDR3 de VH	181	CGGCGGTGGCAGGGTACTTCGATCTC
76	Abx-198	CDR1 de VL	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTGACAGCAGGTAC TTAGCC
77	Abx-198	CDR2 de VL	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	Abx-198	CDR3 de VL	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
79	Abx-221	CDR1 de VH	274	CGCTATGCCATGAAC
80	Abx-221	CDR2 de VH	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACT ACGCAGACTCCGTGAAGGGC
81	Abx-221	CDR3 de VH	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
82	Abx-221	CDR1 de VL	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTA GCC
83	Abx-221	CDR2 de VL	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT

(continuación)

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácido nucleico
84	Abx-221	CDR3 de VL	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT
85	Abx-229	CDR1 de VH	189	CGCTATGCCATGAAC
86	Abx-229	CDR2 de VH	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATAC TACGCAGACTCCGTGAAGGGC
87	Abx-229	CDR3 de VH	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACT AC
88	Abx-229	CDR1 de VL	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAACTTA GCC
89	Abx-229	CDR2 de VL	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	Abx-229	CDR3 de VL	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGT
91	Abx-338	CDR1 de VH	201	AGTTACTACTGGAGC
92	Abx-338	CDR2 de VH	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCA ACCCCTCCCTCAAGAGT
93	Abx-338	CDR3 de VH	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACTAC
94	Abx-338	CDR1 de VL	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACT TAGCC
95	Abx-338	CDR2 de VL	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	CDR3 de VL	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACC
97	Abx-393	CDR1 de VH	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	CDR2 de VH	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACA ACCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	CDR3 de VH	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	CDR1 de VL	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAATGATTTA GGC
101	Abx-393	CDR2 de VL	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	CDR3 de VL	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACG

Se crearon vectores de expresión como se ha descrito anteriormente que contienen la secuencia codificante para la cadena pesada y la cadena ligera de cada uno de los mAb 5F9 y Abx-229.

- 5 La invención se ilustrará mediante los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como una limitación adicional.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Generación y caracterización de anticuerpos anti-GCC

5 La generación de la proteína GCC para la inmunización y exploración se llevó a cabo como se expone a continuación. Se preparó antígeno GCC subclonando una porción del gen GCC que codifica una secuencia que comprende la siguiente secuencia de GCC (secuencia de señal y dominio extracelular) en un vector de expresión.

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFAEPLKNLEDAVNEGLEIVR
 GRLQNAGLNVTVNATFMYS DGLIHNSGDCRSSTCEGLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSTYSTFQMY
 LDTELSYPMISAGSFGSLSCDYKETLTRLMS PARKLMYFLVNFVKTNLDLPFKTYSWSTSYVYKNGTE
 TEDCFWYLNAL EASVSYFSHELGFKVVL RQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLGKDRAV
 AEDIVIILVDL FNDQYFEDNVTAPDYMKNV LVLTLSPGNSLLNSSFSRNLSPTKRDFALAYLNGILLF
 GHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVL LTY
 DTHVNKTYPVDMSPFTFTWKNSKL (SEQ ID NO:229)

10 El vector de expresión (pLKTOK107) proporcionó una región de IgG1Fc C-terminal para su fusión con la secuencia de GCC. Este vector comprendía un exón con las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG1, mutadas para eliminar una
 15 cisteína no emparejada del fragmento CH1 en el exón. Esta región de IgG1Fc se mutó adicionalmente en la lisina 235 y la glicina 237 a alaninas. La construcción se expresó recombinantemente en células 293 de riñón embrionario humano (HEK) transfectadas con el gen para el antígeno T de SV40 como una secuencia de GCC secretada (restos
 de aminoácido 24 a 430 de la SEQ ID NO: 228) fusionada a un Fc de IgG1 humano C-terminal. La proteína, denominada TOK107-hlg (nombre alternativo hGCC-ECD/hlgG1 Fc, SEQ ID NO: 317), se purificó mediante
 cromatografía de proteína A y cromatografía de exclusión por tamaños.

20 También se preparó antígeno GCC subclonando la proteína de fusión anterior en un vector de expresión, tal como pLKTOK111, que permite la fusión de la región transmembrana de IgG2a al extremo C-terminal. Cuando esta
 construcción se expresa recombinantemente en células CHO, el dominio extracelular de GCC se detecta en la superficie celular. Se logra una alta expresión superficial de la proteína de fusión de GCC-Ig (SEQ ID NO: 318) cuando
 se cotransfecta el vector pLKTOK111 con pLKTOK123, que comprende CD79a (MB-1) y CD79b (B29) murinos. Se usó el clon n.º 27 de esta transfección (CHO-GCC n.º 27) como inmunógeno. También se usaron células HT-29-GCC
 25 n.º 2 como inmunógeno.

Para la exploración de sobrenadantes de hibridoma y mAb purificados mediante ELISA, se clonó el ácido nucleico que
 30 codifica una construcción de fusión de GCC en un vector de expresión pCMV1 (Sigma). Marcadores de purificación: también se clonaron el marcador FLAG (en el extremo N-terminal) y el marcador His (en el extremo C-terminal) en la construcción. La construcción de proteína de fusión se transfectó en células 293, se expresó y la proteína recombinante se purificó sobre una columna de afinidad de Anti-FLAG® M2-Agarosa (Sigma).

35 Reactivos y líneas celulares. Se obtuvieron células HEK293, CHO y T84 de cáncer de colon humano de la ATCC y se mantuvieron de acuerdo con los protocolos de la ATCC.

Ratones: Se adquirieron ratones C57BL/6, de 4-6 semanas de edad, de Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY) para
 la generación de los hibridomas murinos. Los Xenomice, criados en el laboratorio hasta las 4-6 semanas de edad, que producen anticuerpos IgG2 humanos, se obtuvieron de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) para la generación de los
 40 hibridomas humanos. Todos los animales se adquirieron y mantuvieron de acuerdo con las guías del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Millennium Pharmaceuticals, Inc.

Líneas celulares: Las líneas celulares usadas para los ensayos funcionales fueron pares de células de células
 45 transfectadas con GCC y células HEK293 o HT29 de control de vector. Las células HT29 se transfectaron con la GCC de longitud completa bajo el control del promotor EF-1 α o el vector vacío (pLKTOK4) y se seleccionaron en G418. Se confirmó que la GCC en estas células tenía una respuesta de GMPC cuando se puso en contacto con el péptido ST (1-18 o 5-18). Las células HEK293 se transfectaron con GCC de longitud completa bajo el control del promotor de CMV o con vector vacío (pN8mycSV40) y se seleccionaron en blasticidina. La GCC en estas células tenía un marcador myc. Los clones seleccionados por su expresión más elevada fueron 293-GCC n.º 2, HT29-GCC n.º 2 y HT29-GCC
 50 n.º 5. Las HT29-GCC n.º 2 también se usaron como inmunógenos para generar moléculas de anticuerpo anti-GCC. Las células que expresan GCC adicionales son las células CT26. Para desarrollar la línea celular CT26 que expresa GCC, se usó el vector pTOK58D. Se clonó GCC de longitud completa en el sitio normalmente usado para la clonación de la cadena pesada y se clonó luciferasa en el sitio normalmente usado para la clonación de cadena ligera. Después de la transfección en células CT26, se confirmó la expresión independiente tanto de GCC como de luciferasa. Se confirmó la expresión superficial de GCC mediante citometría de flujo usando el anticuerpo 5F9. El clon n.º 32 se

seleccionó para estudios adicionales.

5 La línea celular de cáncer de colon T84 expresa GCC de manera endógena. El análisis Taqman de GCC en un amplio panel de líneas celulares reveló que T84 era la única línea celular que expresa ARNm para GCC. La tinción para GCC con un mAb selectivo para GCC en los sedimentos celulares de células T84 demostró una expresión de proteína GCC significativa.

10 La cuantificación de los niveles de receptor de GCC con ligando radiomarcado (ST-toxina) sugirió que las células 293-GCC n.º 2 expresaron más GCC que las células T84, mientras que HT29-GCC n.º 2 o n.º 5 expresaron la menor cantidad de moléculas de GCC por célula.

Línea celular	Ensayo de unión a células completas (receptor/célula)
HT-29-GCC n.º 2/n.º 5	100.000
T84 GCC endógena	300.000
293-GCC	600.000

15 Generación de mAb murinos mediante inmunización con proteína: Se suspendió la proteína de fusión de dominio extracelular de GCC/Ig humana (TOK107-hlg, 50 µg) en suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) y se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se inmunizaron ratones C57BL/6 mediante inyección de la emulsión en tres sitios subcutáneos y un sitio intraperitoneal (i.p.). Dos semanas después de la inmunización inicial, se administró a los ratones por vía i.p. una inmunización de refuerzo con 25 µg de TOK107-hlg en adyuvante incompleto de Freund. Una semana después, se recogió una pequeña cantidad de sangre de la vena caudal y se valoró la actividad de unión en suero contra
20 TOK107-Ig mediante ELISA. Los ratones se seleccionaron para la fusión cuando su título superó 1:24.300 mediante ELISA o 1:500 mediante FACS. Se administró un refuerzo a ratones seleccionados mediante inyección de 25 µg de TOK107-hlg en PBS. Cuatro días después, se sacrificó un ratón y se preparó una suspensión de células de bazo y se lavó con PBS para la fusión con células P3. Un mes después, se prepararon células de bazo de otro ratón para su fusión con células P3. Las células fusionadas se ensayaron para la producción de anticuerpos que se unieron específicamente a GCC mediante ELISA por unión a TOK107-hlg en comparación con un antígeno distinto de GCC o a la región Fc de IgG y mediante FACS para la unión a células T84 o a células Caco-2 o a células HT-29 clon n.º 2 en comparación con el control de vector y se compararon con células MCF-7 que no expresaban GCC. El isotipo se determinó usando el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón ISOSTRIP® (Roche Diagnostics Mannheim, Alemania). Estos esquemas de inmunización y fusiones de hibridoma produjeron las moléculas de anticuerpo anti-GCC murinas 1D3, 8E12, 3G1 y 10B8.
30

35 Generación de mAb humanos. Se inmunizaron ratones modificados por ingeniería genética *XENOMOUSE* (Abgenix, Fremont, CA) (de 8 a 10 semanas de edad) para la producción de anticuerpos monoclonales humanos. Véase, Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green y Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Se emplearon varios esquemas de inmunización. En un esquema, se suspendieron cien microgramos de proteína de fusión de dominio extracelular de GCC humana/Ig humana (TOK107-hlg) en suero salino tamponado con fosfato de Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) y se emulsionó con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se inmunizaron *XENOMOUSE™* mediante inyección de la emulsión en tres sitios subcutáneos, la base de la cola y un sitio intraperitoneal (i.p.). Catorce días después de la inmunización inicial, se administró a los ratones una inmunización de refuerzo con 50 µg de TOK107-hlg en adyuvante incompleto de Freund. Las pruebas en suero indicaron un título insuficiente, por lo que después de unas pocas semanas de reposo, se administró un segundo refuerzo de 50 µg de TOK107-hlg humano. Dos semanas después, se recogió una pequeña cantidad de sangre de la vena caudal y se valoró la actividad de en suero contra TOK107-Ig mediante ELISA y contra células HT29-GCC n.º 2 mediante FACS. Los ratones se seleccionaron para la fusión cuando su título superó 1:24.300 mediante ELISA o 1:500 mediante FACS. Aproximadamente tres meses después de este refuerzo, se reforzó a los ratones con 10⁷ células HT-29 n.º 2 y al día siguiente se les reforzó con 50 µg de TOK107-hlg, ambos en adyuvante incompleto de Freund. Un ratón inmunizado con este esquema produjo las moléculas de anticuerpo anti-GCC humanas 5F9 y 1D2. Un ratón inmunizado con este esquema produjo las moléculas de anticuerpo anti-GCC humanas 5F9 y 1D2. Cuatro días después, se sacrificó a los ratones y se prepararon suspensiones de timocitos y se lavaron con PBS para la fusión.
50 Las células fusionadas se ensayaron para la producción de anticuerpos que se unieron específicamente a GCC mediante ELISA por unión a TOK107-hlg en comparación con un antígeno distinto de GCC o a la región Fc de IgG y mediante FACS para la unión a células T84 o a células HT-29 clon n.º 2 en comparación con el control de vector y se compararon con células MCF-7 que no expresaban GCC. El isotipo se determinó usando ELISA o mediante FACS usando anticuerpos secundarios IgG o IgM específicos. Un ratón inmunizado con este esquema produjo las moléculas de anticuerpo anti-GCC humanas 5F9 y 1D2.
55

60 En otro esquema, se usaron células CHO-GCC n.º 27 (5 x 10⁶) que comprendían el vector pK107111 y que expresaban el dominio extracelular de GCC en sus superficies como inmunógeno dos veces con dos semanas entre inmunizaciones BIP (base de la cola + intraperitoneal). Después de tomar muestras de sangre para identificar la reactividad anti-GCC mediante ELISA contra TOK107-hlg, se reforzó a los ratones con células HT-29 GCC n.º 2 (ya

sea tres semanas o más de dos meses desde el refuerzo anterior). Cuatro días después del último refuerzo, se recogió el bazo respectivo para la fusión celular. Las células fusionadas se ensayaron para la producción de anticuerpos que se unieron específicamente a GCC mediante ELISA por unión a TOK107-hlg en comparación con un antígeno distinto de GCC o a la región Fc de IgG y mediante FACS para la unión a células HT-29 clon n.º 2 en comparación con el control de vector, células T84 o células MCF-7 que no expresan GCC. El isotipo se determinó usando ELISA. Estos esquemas de inmunización y fusiones de hibridoma produjeron las moléculas de anticuerpo humanas anti-GCC 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 y 1C9.

Hibridomas que producen mAb humano: Se contaron células de bazo y se mezclaron con células de mieloma SP 2/0 (ATCC n.º CRL8-006, Rockville, MD) que no tienen la capacidad de secretar cadenas de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera a una relación de bazo:mieloma de 2:1. Las células se fusionaron con polietilenglicol 1450 (ATCC) en 12 placas de cultivo tisular de 96 pocillos en medio de selección HAT de acuerdo con procedimientos convencionales. Entre 10 y 21 días después de la fusión, las colonias de hibridoma se volvieron visibles y se recogieron sobrenadantes de cultivo y después se exploraron mediante ELISA y FACS.

Generación de anticuerpos basada en la tecnología SLAM: También se aislaron anticuerpos monoclonales mediante la tecnología SLAM de Abgenix (Babcock et al PNAS 93:7843-7848 (1996)). La configuración inicial en este método fue inmunizar a los ratones XENOMOUSE con antígeno GCC mediante un esquema entre los descritos a continuación. Después, la etapa de SLAM (método de anticuerpo de linfocito seleccionado) implica, en primer lugar, identificar entre una gran población de células linfoides, un solo linfocito que está produciendo un anticuerpo con una especificidad o función deseada y después, rescatando de este linfocito la información genética que codifica la especificidad del anticuerpo. La región variable de dicho linfocito (que inicialmente produce un anticuerpo IgG2 o IgG4) se amplifica y transfiere a un vector que porta el isotipo IgG1.

Los esquemas de inmunización para los anticuerpos de SLAM (por ejemplo, Abx-229, -012, -221, -020, -338, -106, -198 o -393) incluyeron el uso de TOK-hlg o TOK-hlg conjugada a hemocianina de lapa californiana. Las inmunizaciones fueron o bien a través del pániculo plantar o una combinación de la base de la cola e intraperitoneal. La inmunización inicial con 10 µg de inmunógeno incluyó o bien el adyuvante TITERMAX® Gold o adyuvante completo de Freund. Se efectuaron de seis a ocho refuerzos con 5 µg de inmunógeno, usando alumbre, adyuvante TITERMAX® Gold o adyuvante incompleto de Freund. En caso de que TITERMAX Gold fuese el adyuvante inicial, el alumbre fue el adyuvante de refuerzo y se llevaron a cabo refuerzos a intervalos de 3 a 4 días. Si la inmunización inicial y los refuerzos emplearon los adyuvantes completo y después incompleto de Freund, los intervalos entre refuerzos se efectuaron a intervalos de aproximadamente dos semanas. Los ensayos de títulos en suero en los refuerzos cuarto a sexto en ocasiones fueron seguidos de refuerzos adicionales. El refuerzo final antes de la recogida cuatro días después empleó el inmunógeno en PBS.

Análisis de mAb mediante ELISA. Se recubrieron placas EIA de 96 pocillos con alta unión de proteína (Costar/Corning, Inc. Corning, NY) con 50 µl/pocillo de una solución de 2 µg/ml (0,1 µg/pocillo) de TOK107-hlg y se incubaron durante una noche a 4 °C. El exceso de solución se aspiró y se lavaron las placas con PBS/Tween-20 al 0,05 % (tres veces), después se bloqueó con seroalbúmina bovina al 1 % (BSA, fracción V, Sigma Chemical Co., MO) durante 1 h a temperatura ambiente (TA) para inhibir la unión no específica. Se retiró la solución de BSA y se añadieron 50 µl/pocillo del sobrenadante de hibridoma para cada placa de fusión. Después, se incubaron las placas durante 45 min a 37 °C y se lavaron tres veces con PBS/Tween-20 al 0,05 %. Se añadió anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante (HRP) o F(ab)2 anti-IgG humana (H y L) (Jackson Research Laboratories, Inc., Wet Grove, PA) diluido a 1:4000 en BSA al 1 %/PBS a cada pocillo y después se incubaron las placas durante 45 min a 37 °C. Después de lavar, se añadieron 50 µl/pocillo de solución de ABTS (Zymed, South San Francisco, CA). La intensidad del color verde de los pocillos positivos a 405 nm se evaluó en un lector de placas de microtitulación Vmax (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA). Todos los pocillos de hibridoma que dieron una respuesta positiva se expandieron posteriormente a cultivos de 24 pocillos, se subclonaron mediante dilución limitante y se analizaron mediante ELISA y FACS. Los tres subclones con mejor producción se expandieron adicionalmente.

Análisis del mAb mediante citometría de flujo. Se llevó a cabo una exploración por citometría de flujo (FACS) en todos los sobrenadantes de la placa de fusión en paralelo con la exploración de ELISA. Se cultivaron células HT-29 clon n.º 2 o HT-29 no transfectadas en matraces T225 (Costar/Corning, Inc., Corning, NY) en DMEM (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino al 10 % (GIBCO). Las células se desprendieron de la superficie del matraz usando Versene (GIBCO), se recogieron y se lavaron dos veces con DMEM, después una vez con BSA al 1 %/PBS. Las células se resuspendieron en BSA al 1 %/PBS y se añadieron 2x10⁶ células a cada pocillo de placas de 96 pocillos de fondo en V (Costar) y se centrifugaron durante 5 min a 2500 RPM (lavado). Se desechó la solución de lavado y se añadieron 50 µl/pocillo del sobrenadante para cada placa de fusión. Se aplicó un sellador de placas (Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH) y después las placas se agitaron cuidadosamente en un agitador vorticial para resuspender y mezclar las células con los sobrenadantes y se incubaron a 4 °C (sobre hielo) durante 30 min. Después, se lavaron las placas con BSA al 1 %/PBS frío (tres veces) y 50 µl/pocillo de F(AB)2 (H y L) de burro anti-IgG de ratón conjugado a FITC o F(AB)2 (H y L) de cabra anti-IgG humana conjugado a FITC (Jackson) diluido a 1:50 a cada pocillo durante 30 min a 4 °C (sobre hielo en la oscuridad). Después, se volvieron a lavar las placas en BSA al 1 %/PBS y se fijaron en paraformaldehído al 1 % (Sigma)/PBS. Las células se transfirieron a tubos cluster (Costar) y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA). Posteriormente, se expandió cualquier pocillo de

hibridoma que mostró un desplazamiento positivo a cultivos de 24 pocillos, subclonado mediante dilución limitante.

5 Ensayo de internalización. Se evaluó la internalización de las moléculas de anticuerpo anti-GCC tanto en células que expresan GCC como en células de control de vector, usando microscopía de inmunofluorescente. Las células se cultivaron sobre portaobjetos y se colocaron sobre hielo durante 10 minutos antes de la incubación con 10 µg/ml de anticuerpo en medio de cultivo frío durante 20 minutos sobre hielo. Para la internalización, se reemplazó el medio que contenía anticuerpo con medio de cultivo fresco y se cambiaron las células a 37 °C durante 2-3 horas o se mantuvieron sobre hielo. Después de enjuagar en PCS y fijar brevemente en paraformaldehído al 4 % a temperatura ambiente, se permeabilizaron las células durante 15 min en TRITON X-100 al 0/5 %. Se determinó la localización del anticuerpo de ensayo usando un anticuerpo anti-IgG marcado fluorescentemente mediante microscopía confocal láser de barrido. 10 Las moléculas de anticuerpo se localizaron en la superficie celular de células que expresan GCC sobre hielo. Tras incubar a 37 °C, 5F9 mostró una tinción por puntos dentro de la membrana celular, lo que indica internalización. No se detectó internalización con las células de vector.

15 Resumen de las propiedades de moléculas de anticuerpo anti-GCC. La mayoría de los anticuerpos generados en el presente documento se ensayaron en varios de los ensayos descritos anteriormente. La tabla 7 resume las propiedades *in vitro* para cada uno. (T84=células de tumor de colon humano, MCF7=células de tumor de mama humano, WB=transferencia de Western, IP=inmunoprecipitación, IHC=inmunohistoquímica; la internalización usó células T84 en comparación con células MCF-7)

20

Tabla 7. Propiedades de las moléculas de anticuerpo anti-GCC

Ab	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hlg	TOK8 2-hlg	HT-29 n.º 2	HT-29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	Internalización
8F1	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+		+	
3G1	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10B8	+	-	+	-	+	-	-	+	+	
5H3	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6H8	+	-	+	-	+	-	-	+		+
8C2	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10C10	-	-	+	-	+	-	-	+		
10D3	+	-	+	-	+	-	+	+		
1D2	+	-	+	-	+	-	-	+		
4A12	+	-	+	-	+	-	-	+		
5F9	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+
1C9	+	-	+	-	+	-	-	+		
Abx-012	+		+				-	+	+	+
Abx-015	+		-				+	+		
Abx-020	+		+				-	+		+
Abx-106	+		+					+		-
Abx-198	+		+					+		+
Abx-221	+		+					+		+
Abx-229	+		+					+		+
Abx-252	+		+					+		+

(continuación)

Ab	ELISA		FACS							
	TOK1 07-hlg	TOK8 2-hlg	HT-29 n.º 2	HT-29	T84	MCF7	WB	IP	IHC	Internalización
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

Además, se evaluó la capacidad de algunos anticuerpos para inhibir el flujo de iones de calcio inducido por el péptido ST en células que expresan GCC. El ensayo de GMPc se llevó a cabo en células HT29-GCC n.º 18 en presencia de ST 50 nM en presencia o ausencia de moléculas de anticuerpo anti-GCC. Hubo una inhibición dependiente de la dosis del flujo de iones de calcio por 5F9. Otros anticuerpos, 5H3 y Abx-338 también inhibieron el flujo de iones calcio inducido por ST.

Estimación de la afinidad relativa de moléculas de anticuerpo anti-GCC. Las afinidades relativas (CE50; concentración de anticuerpo para unión semimáxima) de algunas moléculas de anticuerpo anti-GCC se estimaron a partir de mediciones de ELISA frente a TOK107-hlg y mediante mediciones FACS con células que expresan GCC. La tabla a continuación muestra algunos resultados.

Tabla 8. CE50 de moléculas de anticuerpo anti-GCC

Anticuerpo	CE50, TOK107-hlg, M	CE50, Células, M
5F9	$3,65 \times 10^{-8}$	$1,24 \times 10^{-9}$
5H3	$4,16 \times 10^{-9}$	$4,7 \times 10^{-7}$
Abx-338	$4,9 \times 10^{-12}$	$9,0 \times 10^{-8}$
3G1	$2,28 \times 10^{-8}$	$5,8 \times 10^{-10}$
Abx-229	$2,95 \times 10^{-8}$	
Abx-221	$6,55 \times 10^{-9}$	
Abx-020	$4,58 \times 10^{-9}$	
Abx-012	$5,55 \times 10^{-10}$	
Abx-198	$4,77 \times 10^{-8}$	

Medición de la afinidad de moléculas de anticuerpo anti-GCC. Se usó un sistema BIACORE™ T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) para medir la afinidad del anticuerpo anti-GCC 5F9 a 22 °C.

Etapa 1: Se diluyó el mAb 5F9 (Prep A) a 20 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0 y el mAb de referencia 5F9 (Prep B) se diluyó a 10 µg/ml en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0. Se inmovilizó covalentemente cada mAb a varias placas BIACORE CM4 usando acoplamiento de amina estándar. Para cada placa CM4 preparada, se inmovilizó Prep A 5F9 a lo largo de dos celdas de flujo aproximadamente a 75-100 UR mientras que Prep B 5F9 se inmovilizó en una celda de flujo a aproximadamente 70-80 UR. La cuarta celda de flujo restante de cada placa CM4 se usó como celda de flujo de referencia.

Etapa 2: Se determinó la concentración madre de GCC-ECD-Fc (TOK107-hlg) usando los métodos detallados por Pace et al. en Protein Science, 4:2411 (1995) y Pace y Grimsley in Current Protocols in Protein Science 3.1.1-3.1.9 (2003).

Etapa 3: Para cada placa CM4 preparada descrita en la Etapa 1, se inyectó GCC-ECD-Fc durante 2 minutos a un intervalo de concentración de 202 nM - 1,6 nM (dilución seriada 2x) seguido de una disociación de 7 minutos. Las muestras se inyectaron aleatoriamente por triplicado con varios ciclos de inyección de tampón espaciados para doble referenciación. Para obtener datos de reducción de la velocidad de disociación más significativos, se llevaron a cabo tres inyecciones adicionales de GCC-ECD-Fc 101 nM y tres inyecciones adicionales de tampón con una inyección de 2 minutos y un tiempo de disociación de 4 horas. Se usó un caudal de 100 µl/min para todos los experimentos y se regeneraron todas las superficies con un pulso de 20 segundos de glicina-HCl 10 mM (pH 2,0). Todas las muestras se prepararon en el tampón de ejecución que fue suero salino tamponado con Hepes, polisorbato 20 al 0,005 %, pH 7,4 (HBS-P) con 100 µg/ml de BSA añadido.

Etapa 4: Todos los datos de sensograma (gráfica de resonancia de plasmón superficial frente al tiempo) se

procesaron con el programa informático Scrubber 2.0 (BioLogic Software, Campbell, Australia) y se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 que incluye un término para la constante de transporte de masa k_m usando el programa CLAMP™ (Myszka y Morton Trends Biochem. Sci. 23:149-150 (1998)).

- 5 El modelo 1:1 proporcionó un muy buen ajuste para los datos en tanto que los niveles de inmovilización del mAb se mantuvieron lo suficientemente bajos, de tal forma que la $R_{m\acute{a}x}$ resultante del análisis global de los datos del sensograma se encontraban al menos por debajo de 12 UR para cada superficie. En la mayoría de los casos, una de las dos superficies de Prep A 5F9 tenía una $R_{m\acute{a}x}$ demasiado baja (por debajo de 2 UR) para las mediciones cinéticas fiables. Sin embargo, siempre que fue posible, se ajustaron simultáneamente los datos de dos celdas de flujo de unión de GCC-ECD-Fc a PrepA 5F9 de la placa CM4. Cuando las superficies del mAb se prepararon dando como resultado una mayor $R_{m\acute{a}x}$ (> 12 UR), los sensogramas mostraron claramente una cinética compleja y por tanto, un modelo 1:1 ofrece un mal ajuste de los datos. Esto no es sorprendente debido al hecho de que GCC-ECD-Fc es una construcción bivalente y una mayor densidad de superficie de mAb inmovilizado con mayor probabilidad aumenta la probabilidad de que GCC-ECD-Fc se una con avidez a la superficie. Los replicados indicados para este estudio incluyen únicamente aquellos datos que se ajustan bien al modelo de interacción 1:1. Las K_D y las constantes de velocidad resultantes de todos los replicados para Prep A 5F9 y el mAb de referencia Prep B se listan en la tabla 9 y la tabla 10, respectivamente.

Tabla 9: Unión de GCC-Fc a mAb Prep A 5F9 inmovilizado

Replicado	$R_{m\acute{a}x}$ (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
A	11	$1,06 \times 10^5$	$1,19 \times 10^{-5}$	112
B	8	$1,20 \times 10^5$	$1,10 \times 10^{-5}$	91,7
C	5	$1,07 \times 10^5$	$2,15 \times 10^{-5}$	201
D	9	$1,22 \times 10^5$	$1,11 \times 10^{-5}$	91,0
E	6,4	$9,64 \times 10^4$	$1,77 \times 10^{-5}$	184
Media (Int. de Conf. al 95 %)		$1,10 (0,13) \times 10^5$	$1,46 (0,59) \times 10^{-5}$	136 (65)

20

Tabla 10: Unión de GCC-Fc a mAb Prep B 5F9 inmovilizado

Replicado	$R_{m\acute{a}x}$ (UR)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_D (pM)
F	9	$9,68 \times 10^4$	$7,64 \times 10^{-6}$	78,9
G	8	$1,20 \times 10^5$	$1,24 \times 10^{-5}$	103
H	7	$9,09 \times 10^4$	$9,57 \times 10^{-6}$	105
I	12	$1,21 \times 10^5$	$1,54 \times 10^{-5}$	127
Media (Int. de Conf. al 95 %)		$1,07 (0,25) \times 10^5$	$1,13 (0,54) \times 10^{-5}$	103 (31)

Conjugación de toxinas a anticuerpos

- 25 Maitansinas. Se generaron anticuerpo de ratón anti-humano (MAH)-IgG-DM1 y anti-GCC-DM1 de acuerdo con un proceso en una etapa para la producción de conjugados citotóxicos de maitansinoides como se describe en la patente de los Estados Unidos n.º 6.441.163.

- 30 En resumen, se conjugaron maitansinoides a anticuerpos usando procedimientos publicados. Se conjugó DM1 a los anticuerpos usando reticulante SMCC heterobifuncional (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato; Chari et al. Cancer Research 52:127-131 (1992). Se conjugó DM4 a anticuerpos usando el reticulante heterobifuncional SPDB (Widdison et al. J. Med. Chem. 49:4392-4408 (2006)). El anticuerpo conjugado se separa de los subproductos de reacción no reaccionados mediante cromatografía de filtración en gel usando una columna SEPHADEX™ G-25.

- 35 Auristatinas. La conjugación con auristatinas puede llevarse a cabo usando procedimientos publicados (por ejemplo, Doronina et al., Nature Biotech., 21: 778-784 (2003)). En general, las auristatinas se enlazan a las cisteínas de las cadenas de anticuerpo. El enlace a cisteínas se logra en primer lugar mediante reducción de enlaces disulfuro en la molécula de anticuerpo. El control del proceso de reducción pretende limitar la reducción en algunos, pero no necesariamente todos, los enlaces disulfuro intercadena. Por consiguiente, las auristatinas tienen la capacidad de unirse en las cisteínas libres. La inactivación de la reacción de conjugación va seguida de la retirada de los subproductos de reacción y el intercambio del tampón a la formulación deseada.

40

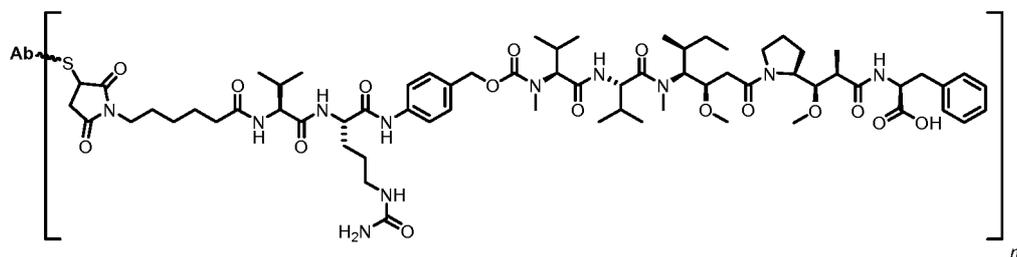
En resumen, se preequilibra una molécula de anticuerpo anti-GCC a 7,6 mg/ml a 37 °C y después se añade un volumen del 15 % de borato de sodio 500 mM, pH 8,0 para elevar el pH a 7,5-8,0. La solución también contiene DTPA 1 mM. El anticuerpo se reduce parcialmente añadiendo 2,6 equivalentes de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) por mol de moléculas de anticuerpo anti-GCC y agitación a 37 °C. Después de 28 minutos, se coloca sobre hielo la solución de molécula de anticuerpo anti-GCC reducido, después se trata inmediatamente con 4,8-4,9 equivalentes molares (en relación con la molécula de anticuerpo anti-GCC) de enlazador de fármaco (por ejemplo, mc-vc-MMAF o mc-vc-MMAE o mc-MMAF) en forma de una solución 20,5 mM en DMSO. Se introduce DMSO adicional para poner la mezcla a un 10 % de DMSO en volumen. La mezcla de reacción se agita sobre hielo durante ~90 minutos antes del tratamiento con un exceso molar de 5 veces de N-acetil cisteína (en relación con mc-vc-MMAF). El conjugado se aísla mediante filtración de flujo tangencial, concentrándose en primer lugar a ~10 mg/ml, después se diafiltró con ~10 diavolumenes de PBS. Los conjugados de anticuerpo-fármaco tuvieron una carga media de fármaco de aproximadamente cuatro unidades de fármaco-enlazador por anticuerpo. Por conveniencia, en los siguientes ejemplos y las figuras adjuntas, los inmunoconjugados con auristatina se citan en el siguiente formato abreviado, independientemente de la carga de fármaco: "Ab-vc-MMAF" se refiere a una molécula de anticuerpo anti-GCC conjugada con mc-vc-MMAF; "Ab-vc-MMAE" se refiere a una molécula de anticuerpo anti-GCC conjugada con mc-vc-MMAE; y "Ab-mc-MMAF" se refiere a una molécula de anticuerpo anti-GCC conjugada con mc-MMAF. Los inmunoconjugados que comprenden moléculas de anticuerpo anti-GCC específicas se citan en el mismo formato, .por ejemplo, 5F9-vc-MMAF, 5F9-vc-MMAE y 5F9-mc-MMAF.

Para preparar los conjugados de anticuerpo-fármaco con una carga media de fármaco de aproximadamente dos unidades de fármaco-enlazador por anticuerpo, se modifica el protocolo (anterior) reduciendo la cantidad de TCEP en un 50 %. La cantidad de fármaco-enlazador también se reduce en un 50 %. El conjugado de anticuerpo-fármaco correspondiente se abrevia como Ab-vc-MMAF(2).

Preparación de 5F9 vcMMAE

Usando un método similar al método general expuesto anteriormente, se conjugó el mAb 5F9 a un derivado de auristatina denominado MMAE (fórmula (XIII)) usando un enlazador vc (Val-Cit) descrito en el presente documento para crear el inmunoconjugado denominado 5F9 vcMMAE. La conjugación del enlazador vc a MMAE (Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA) se completó como se ha descrito anteriormente (véase, por ejemplo, el documento US 2006/0074008).

En resumen, se ajustó una solución de 17,8 mg/ml del mAb 5F9 en acetato 100 mM a pH 5,8 a pH 8 con fosfato de sodio dibásico 0,3 M, dando una concentración final de mAb de 11,3 mg/ml. Después, se añadió DTPA hasta una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción. Después, se redujo parcialmente el mAb añadiendo 2,28 equivalentes molares de TCEP (en relación a los moles de mAb) y después se agitó a 37 °C durante 1,5 horas. Después, se enfrió la solución de mAb parcialmente reducido a 4 °C y se añadieron 4,4 equivalentes molares de vcMMAE (en relación con los moles de anticuerpo) como una solución 20,3 mM en DMSO. La mezcla se agitó durante 30 minutos a 22 °C, después durante 15 minutos adicionales después de la adición de 5 equivalentes molares de N-acetilcisteína (en relación con los moles de vcMMAE). Se retiraron el exceso de vcMMAE inactivado y otros componentes de reacción mediante ultrafiltración/diafiltración del inmunoconjugado con 10 diavolumenes de PBS, pH 7,4. El inmunoconjugado resultante se denominó 5F9 vcMMAE y tiene la siguiente fórmula:



donde Ab es el mAb 5F9 y m es de 1 a 8. La carga media de fármaco (m) fue de aproximadamente 3,6.

Ensayos de citotoxicidad. Para medir la capacidad de cada anticuerpo para unirse a, internalizar y eliminar las células diana, se llevaron a cabo ensayos de citotoxicidad. En este ensayo, se incubaron células con diversas concentraciones del anticuerpo primario anti-GCC no conjugado y una concentración fija no tóxica de anticuerpo secundario anti-Fc humano conjugado a DM1 (citotoxicidad indirecta) o con diversas concentraciones de mAb anti-GCC conjugado a toxina (citotoxicidad directa). La viabilidad celular se midió mediante ensayo WST después de 4 días de incubación. La potencia relativa de los anticuerpos anti-GCC humanos en células 293-GCC n.º 2 se muestra en la tabla 8 y se determinó usando un mAb de ratón anti-IgG humana conjugado a DM1 (MAH-IgG se purificó del clon HP607 (CRL1753, ATCC). 5F9 y 229 son los mAb anti-GCC más potentes, con DL50 de 26 y 78 pM. Aunque aquí no se muestra, el error es generalmente de aproximadamente un 20 % de estas medias, como se mide mediante el intervalo de replicados o desviación típica de > 2 replicados.

Tabla 11. Resultados del ensayo de citotoxicidad para anticuerpos anti-GCC en células 293-GCC n.º 2

Ab anti-GCC	DL50 (pM)
5F9	26
229	78
106	166
221	207
338	267
12	279
20	569
5H3	722
10D3	1596
8C2	2038
10C10	2443
1D2	>3055
6H8	>4818
393	>5400
198	>5400

5 Unión a la superficie celular. La unión de 5F9 no conjugado o de 5F9 conjugado a auristatinas, se evaluó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecto usando citometría de flujo. Se sembraron 1×10^6 células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo en V y se incubaron sobre hielo durante 1 hora con diluciones seriadas del anticuerpo de 1-0,001 µg/ml. Las células se lavaron dos veces con FBS al 3 % en PBS enfriado en hielo y se incubaron con IgG de ratón anti-PE humano a 1:200 (Southern Biotech 2043-09) durante 1 hora sobre hielo. Las células se lavaron nuevamente y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Los datos se analizaron usando el programa informático del sistema FACS Canto II y se determinaron las intensidades medias de fluorescencia.

15 Mapeo de epítomos. Se iniciaron múltiples estrategias para identificar epítomos. Matriz de péptidos. Se generaron péptidos 20-meros con un solapamiento de 15 aa, que abarcaban el dominio extracelular (ECD) en el dominio transmembrana de GCC (aa 1-440). Los péptidos se sintetizaron y se proporcionaron como matrices, inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio. Las matrices se hibridaron con cada uno de los anticuerpos anti-GCC para determinar si los péptidos lineales eran suficientes para la unión. Abx-198 se unió a los péptidos 55 y 56, mientras que los anticuerpos 3G1, 8F1 y 10B8 se unieron a los péptidos 55, 56 y 57. La secuencia, ILVDLFNDQYLEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (SEQ ID NO: 225) está abarcada por estos péptidos. Una región de solapamiento entre los péptidos es LEDNVTAPDY (SEQ ID NO: 314). Abx-012, Abx-338 y Abx-106 se unieron a los péptidos 71 y 72. La secuencia, FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO: 226) y la secuencia RNLTFEGYDGPVTLDD (SEQ ID NO: 315) se solapan en los dos péptidos.

25 Unión en la superficie celular a mutantes de truncamiento de GCC. Se generaron mutantes de truncamiento del EDC de GCC (FL péptido maduro y 8 truncamientos (Δ 1-32, Δ 1-49, Δ 1-94, Δ 1-128, Δ 1-177, Δ 1-226, Δ 1-279, Δ 1-229 y Δ 1-379), como construcciones marcadas con FLAG (pFLAG-CMV-3), que representan incrementos de eliminación de aproximadamente 50 aa. Las construcciones se expresaron en células 293, seguido de inmunoprecipitación mediante la molécula de anticuerpo anti-GCC y transferencia de Western para el epítomo de FLAG en lisados de células 293 transfectadas con los mutantes de ECD de GCC. El anticuerpo 5F9 se une a células con la mutación Δ 1-32, pero no a células con la mutación Δ 1-49. La unión de 5F9 a GCC se perdió cuando se truncó la proteína entre los aa 33-50, lo que sugiere que esta región está implicada en el reconocimiento de 5F9 de su epítomo de unión en GCC. Sin embargo, debido a que las secuencias de GCC de rata y ratón son idénticas a GCC humana en esta región y a que 5F9 no se une a GCC de ratón o de rata, el anticuerpo 5F9 probablemente se une a un epítomo conformacional formado por la presencia de los aminoácidos 33 a 50 de GCC humana.

35 EJEMPLO 2. Selección de toxina-enlazador/caracterización de la ADC

En una estrategia de conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC), la conjugación de toxinas altamente potentes a anticuerpos, puede dirigirse la citotoxicidad de la toxina a tumores de una manera específica de diana, administrando

la toxina a células tumorales que expresan antígeno sin afectar a las células negativas para el antígeno en tejidos normales, reduciendo de este modo la toxicidad sistémica. Las toxinas de la clase de auristatina (análogo de dolastatina 10) y maitansina se evaluaron como ADC con el mAb anti-GCC. Todas estas toxinas son inhibidores de la polimerización de microtúbulos, que actúan como antimitóticos. Las pruebas en las que se pusieron en contacto las células con toxinas libres indicaron que la citotoxicidad de las toxinas libres no se distinguió entre células con expresión de GCC y células de control sin GCC. Estas toxinas libres eran potentes contra el vector de 293, células 293-GCC n.º 2, en HT29-vector frente a células HT29-GCC n.º 5 como se muestra en la tabla 9.

Tabla 12. Citotoxicidad de toxinas libres

Línea celular	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
	LD50	DT	LD50	DT	LD50	DT	LD50	DT
293 vector	0,07	6	3,37	2,34	2,83	2,00	0,79	0,79
293 GCC n.º 2	4	3	2,07	1,48	2,96	2,23	0,83	1,03
HT29	4	1	5,21	1,91	2,69	1,09	0,57	0,27
HT29 GCC n.º 5	7	4	7,65	3,32	1,00	0,14	0,40	0,17

La química mediante la que se conjugan las diferentes toxinas a los anticuerpos difiere y afecta a la estabilidad del enlazador. La estabilidad del enlazador afecta a la ventana terapéutica teniendo impacto en la liberación de fármaco en la sangre de tejidos no diana frente a la liberación del fármaco en el tumor. El enlazador de ADC ideal tiene alta estabilidad mientras se encuentra en la sangre, pero una liberación eficiente tras la entrada en la célula mediada por la diana.

Auristatinas

Se evaluaron tres pares de auristatina-enlazador. Para evaluar en primer lugar estos conjugados *in vitro* y después determinar qué toxina-enlazador para estudios *in vivo* a gran escala, se conjugó 5F9 a vcMMAE, vcMMAF y mcMMAF (20 mg por conjugado).

Las auristatinas son toxinas sintéticas relacionadas con el producto natural dolastatina 10. MMAE y MMAF difieren de manera sutil, teniendo la forma MMAF un grupo ácido carboxílico en la posición R2, reduciendo la permeabilidad celular y la potencia como toxina libre. MMAE es un sustrato de la bomba de fármacos Pgp, mientras que MMAF no lo es.

Las auristatinas se conjugan a cisteínas intercadena mediante un proceso de reducción parcial del anticuerpo, reacción con un derivado de fármaco de maleimido, inactivación con exceso de cisteína, concentración e intercambio del tampón en PBS. Las auristatinas pueden unirse con un enlazador de dipéptido sensible a catepsina B, que se escinde tras la captación celular o con un enlazador no escindible.

En el enlazador de vcMonoMetilAuristatina, se acopla un dipéptido de valina-citrulina al fármaco por medio de un grupo de carbamato de *p*-amino bencilo (PAB) y al anticuerpo a través de un grupo de conjugación de maleimido caproílo. Tras la internalización, el enlazador de dipéptido se escinde por medio de la proteasa lisosómica catepsina B, el grupo PAB se autodestruye y se libera la toxina libre. Este enlazador se diseñó para mantener la estabilidad sérica, mientras que se maximizaba la liberación de fármaco intracelular por catepsina B.

También pueden ligarse auristatinas a anticuerpos por medio de enlazadores no escindibles, tales como MMAF unido directamente al grupo de conjugación de maleimido, sin enlazador sensible a peptidasa. Los ADC conjugados a MC también son eficaces en la eliminación celular mediada por la diana.

Se cree que el mecanismo de liberación de fármaco para los conjugados de auristatina no escindibles es mediante degradación general del anticuerpo en lisosomas. Mediante estudios de CL/EM, se ha comunicado que los conjugados de Ab-mcMMAF liberan toxina en forma de un aducto con cisteína individual.

Unión de conjugados de anticuerpo-fármaco

Todos los conjugados de anticuerpo 5F9-fármaco se unieron a células 293-GCC n.º 2 igualmente bien. La tabla 10 muestra la intensidad media de fluorescencia de los conjugados con 5F9 a concentraciones crecientes de células 293-GCC n.º 2. Otros estudios determinaron que el conjugado 5F9-SPDB-DM4 se unió a células 293-GCC n.º 2 de una manera dependiente de la concentración, mientras que el anticuerpo 209-SPDB-DM4 no se unió.

Tabla 13. Diagrama de IMF del ensayo de unión de 5F9 y conjugados de 5F9 en células 293 GCC n.º 2:

	µg/ml de 5F9 o conjugado de 5F9					
	0,001	0,004	0,016	0,063	0,25	1
5F9	500	937	2465	6615	7816	8026
vcMMAE	445	696	1787	4854	7296	7416
vcMMAF	440	707	1502	4830	7563	7779
mcMMAF	483	776	2106	5353	7398	7585

Se ensayaron los conjugados de 5F9-toxina auristatina en ensayos de citotoxicidad directa en una variedad de células que se habían transfectado con ácido nucleico de GCC y se seleccionaron por su expresión de GCC. Un estudio del nivel de expresión superficial de GCC mostró que las células 293 GCC n.º 2 expresan altas cantidades de GCC; las células HT 29 n.º 2 y CT 26 n.º 2.5 expresan GCC a niveles de intermedios a bajos; las células CT 26 n.º 32 expresan GCC a altos niveles; y las HT 29 GCC n.º 5 y HT 29 GCC n.º 18 expresan bajas cantidades de GCC. La tabla 11 muestra una compilación de múltiples estudios que proporcionan datos de citotoxicidad para los tres conjugados de auristatina en células que expresan la diana o en células de tipo silvestre o células de control de vector. Se observa eliminación potenciada por la diana en todos los casos de toxinas conjugadas con 5F9 en células 293 GCC n.º 2, con una ventana aumentada en gran medida cuando se usa MMAF frente a MMAE. Las formas tanto escindibles como no escindibles de MMAF fueron similarmente potentes. Como control negativo, también se prepararon conjugados de anticuerpo-fármaco con el anticuerpo sc209, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano generado contra una diana no relacionada, sin reactividad contra GCC. Los ensayos de citotoxicidad directa con los ADC de 209 frente al ADC de 5F9 vcMMAF mostraron eliminación celular potenciada por la diana en las células modelo 293 y las células modelo HT29. Una comparación de actividad de toxina conjugada a 5F9 entre las líneas celulares indican que el nivel de citotoxicidad tiene cierta correlación con la cantidad de GCC expresada por las células. Estos datos sugieren que al menos algunas líneas celulares que expresaban la mayor cantidad de GCC eran más susceptibles a la actividad citotóxica del conjugado que las células que expresaban menores cantidades de GCC. Véase el ejemplo 1 para los números relativos de GCC por célula. Otro factor en las diferencias de niveles de citotoxicidad puede ser las diferencias en la internalización o el procesamiento intracelular de los conjugados, que pueden variar entre líneas celulares de tipo silvestre.

Tabla 14. Citotoxicidad de ADC de anti-GCC-auristatina.

Línea celular	DL 50 (nM) de los conjugados de 5F9			DL50 (nM) de los conjugados de 209
	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
293 vector	128	>10	>10	
293 GCC n.º 2	0,37	0,001	0,002	
293 vector	1,8	>10	>10	
293 GCC n.º 2	0,13	0,005	0,007	
293 vector		>10		>10
293 GCC n.º 2		0,0004		>10
HT 29 TS	84	>10	>10	
HT 29 GCC n.º 2	24,1	0,127	3,1	
CT 26 TS	>500	>10	>10	
CT 26 GCC n.º 2.5	>500	>10	>10	
CT 26 GCC n.º 32	267	0,004	0,064	
HT 29 vector	520,6	>10.000	>10.000	
HT 29 GCC n.º 5	653,5	563,2	>10.000	
HT 29 GCC n.º 18	554,6	>10.000	>10.000	
HT29	0,93	>10	>10	

(continuación)

Línea celular	DL 50 (nM) de los conjugados de 5F9			DL50 (nM) de los conjugados de 209
	vcMMAE	vcMMAF	mcMMAF	
HT29 GCC n.º 5	0,59	0,32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC n.º 5		0,035		10

En caso de que estas potencias se tradujesen *in vivo*, con una eficacia igual entre mc y vcMMAF, la mayor MTD predicha para mcMMAF podría sugerir una mayor ventana terapéutica para este conjugado.

5 Maitansinas

Los ADC de 5F9-maitansina mostraron una potente eliminación de la diana en las células 293-GCC n.º 2 (tabla 12). De manera interesante, ambos conjugados de 5F9-maitansina mostraron eliminación potenciada de la diana en el modelo de 293, aunque no se observó eliminación potenciada de la diana en el modelo de HT29, lo que generó dudas acerca de la utilidad de este modelo para la evaluación *in vivo* de los conjugados de maitansina. De nuevo, los motivos para esta diferencia no son fácilmente explicables, pero pueden atribuirse a diferentes densidades del receptor y/o diferencias en la internalización o procesamiento de los conjugados dentro de las células. Como control negativo, también se prepararon conjugados de anticuerpo-fármaco con el anticuerpo sc209, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano contra una diana no relacionada, sin reactividad contra GCC. Los ensayos de citotoxicidad directa con los ADC de 209 frente a los ADC de 5F9 muestran eliminación celular potenciada por la diana en las células modelo 293 con todos los conjugados de 5F9. En las células modelo HT29, los conjugados 5F9-DMx y los conjugados 209-DMx tienen una eliminación igualmente buena, lo que indica un mecanismo de eliminación no específico de diana en estas células.

20

Tabla 15. Citotoxicidad de ADC de anti-GCC-maitansina

Línea celular	DL50 (nM)			
	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 vector	25,3		10,4	
293 GCC n.º 2	<0,004		<0,004	
293 vector	32	11	13	7,4
293 GCC n.º 2	<0,000004	6,7	<0,000004	4,8
HT29	22,4		7,7	
HT29 GCC n.º 5	20,8		9,1	
HT29	22	12	4,8	2,1
HT29 GCC n.º 5	30	22	5,8	4,2

EJEMPLO 3: Evaluación *in vivo*

Modelos tumorales:

25

Se evaluó la citotoxicidad *in vivo* de los ADC de 5F9 en modelos de xenoinjerto de ratón. El trabajo inicial *in vivo* se efectuó con las líneas celulares HT29-GCC n.º 5 y n.º 18. La línea celular 293-GCC n.º 2 también se evaluó respecto de su crecimiento *in vivo* y se desarrolló como un modelo trasplantable en serie mediante trócar.

30

Para abordar la cuestión de si el nivel de expresión de GCC en el modelo de xenoinjerto era relevante para el nivel de expresión de GCC en pacientes con cáncer de colon metastásico, se compararon los niveles de expresión de GCC mediante análisis IHC de tejido de xenoinjerto, tumores de colon primarios humanos y metástasis. Se utilizó un panel de líneas celulares frescas congeladas para la cuantificación de GCC mediante rIHC con un mAb de ratón para GCC 3G1. Para la cuantificación por IHC, se efectuó una puntuación usando un sistema de puntuación de 0-3 semicuantitativo. En caso de que los niveles de GCC del modelo tumoral \leq niveles clínicos de GCC, el modelado será probablemente preciso o sobreestimar la exposición necesitada clínicamente. En caso de que los niveles de GCC del modelo tumoral $>$ niveles clínicos de GCC, el modelado puede subestimar la exposición necesitada clínicamente.

35

Aunque hubo cierto grado de variabilidad en la expresión de GCC en muestras metastásicas, la expresión por las células HT29-GCC n.º 5 y n.º 18 se encontró en el intervalo de muestras de las muestras metastásicas. Mediante IHC, la tinción de GCC en las células HT29-GCC n.º 5 y n.º 18 fue equivalente o menor a la de las células metastásicas. Estos datos sugieren que los presentes modelos tumorales expresan GCC a niveles comparables a los niveles hallados en muestras clínicas de metCRC.

La tabla 16 representa los recuentos de centelleo para diversos tejidos recogidos en el punto de tiempo de 192 horas, representándose las medias para tres animales. 5F9 se acumuló preferencialmente en tumores de HT29-GCC n.º 5 frente a tumores de HT29-vector, mientras que las 209 no mostraron demasiada acumulación diferencial. Este resultado refuerza que puede esperarse que los conjugados de anticuerpo 5F9-fármaco se acumulen en tumores que expresan GCC. En todos los demás tejidos evaluados, hubo poca diferencia en los niveles de acumulación de anticuerpo 5F9 frente al mAb 209.

Distribución in vivo de 5F9 radiomarcado en ratones portadores de tumores HT29-GCC n.º 5 y HT29-vector

Se llevó a cabo un estudio de por radioimagen en ratones portadores de tumores para evaluar el direccionamiento a tumores y la biodistribución *in vivo* del anticuerpo anti-GCC 5F9 y un anticuerpo de control negativo sc209 (anticuerpo monoclonal IgG1 humano que se dirige a una diana de la superficie celular no relacionada). Los anticuerpos se radiomarcaron con ¹¹¹In usando DTPA como quelador bifuncional. El comportamiento *in vivo*, que incluye el direccionamiento a tumores y la biodistribución en tejidos normales con el tiempo, se investigó con un modelo de tumor dual murino con tumores tanto GCC(-) como GCC(+). Se tomaron imágenes *in vivo* (SPECT/CT) y se usó recuento de radiactividad en tejido para complementar la resolución espacial.

Los tumores subcutáneos se dejaron crecer en ratones desnudos, con tumores de HT29-vector en el lado derecho y tumores de HT29-GCC n.º 5 en el lado izquierdo. Se dosificaron los anticuerpos a 0,3 mCi = 15 µg por animal. Hubo tres animales por grupo y los grupos se recogieron a 1 h, 24 h, 48 h, 72 h, 120 h y 192 h.

Un estudio de tejidos de animales en el grupo de 192 h indicó que tanto 5F9 como 209 se acumularon en un grado similar en la mayoría de tejidos normales (por ejemplo, sangre, corazón, estómago, intestino delgado, intestino grueso, músculo y piel) y en tumores de control de HT29-vector. El Ab 209 se acumuló en niveles ligeramente menores que 5F9 en el hígado y 5F9 se acumuló a niveles ligeramente mayores que 209 en los pulmones, el bazo y los riñones. En los tumores HT29-GCC n.º 5, 5F9 se acumuló preferencialmente a niveles más de dos veces mayores que los niveles de 209. Este resultado refuerza que puede esperarse que los conjugados de anticuerpo 5F9-fármaco se acumulen en tumores que expresan GCC.

Para entender la cinética de la acumulación de anticuerpo en tumores, se obtuvieron datos de tumores para cada anticuerpo para todos los puntos de tiempo a lo largo del estudio. El único tejido que mostró acumulación del anticuerpo 5F9 en el tumor que expresa GCC. El nivel de radiactividad en todos los demás tejidos permaneció relativamente plano, observándose poca diferencia entre los niveles de 5F9 y los niveles de 209. 5F9 se acumuló preferencialmente en tumores de HT29-GCC n.º 5, mientras que 209 no mostró acumulación alguna. Este resultado refuerza que puede esperarse que un conjugado de anticuerpo 5F9-fármaco se acumule en tumores que expresan GCC.

Tabla 16. Acumulación de mAb específico para GCC marcado con ¹¹¹In pero no mAb de control en tumores que expresan GCC.

	Media de % DI de 5F9	Media de % DI de IgG de ctr
1h	2,816+/-0,133	2,494+/-0,167
24h	3,057+/-0,107	3,010+/-0,630
72h	4,485+/-1,029	3,564+/-0,152
120h	5,162+/-1,012	3,412+/-0,048
192h	6,550+/-1,015	2,782+/-0,085

La acumulación de 5F9 radiomarcado en tumores que expresan GCC a lo largo de 7 días respaldó una pauta posológica de una vez a la semana.

Estudios piloto de eficacia en tumores s.c. de HT29-GCC n.º 5

Se llevaron a cabo estudios para determinar conjugados y pautas posológicas eficaces en ratones portadores de tumores de HT29-GCC n.º 5. Se administraron a los ratones dosis únicas o múltiples. Estos estudios determinaron que había toxicidad con una dosificación demasiado frecuente a niveles mayores de conjugado con toxina (por ejemplo, 150 µg/kg de 5F9vcMMAF con una pauta q3d x 5). Otro estudio determinó que la pauta q14d x 5 era demasiado infrecuente en este modelo para permitir que algunos conjugados con toxina mostrasen una eficacia

significativa frente a los controles. Además, un estudio PD con conjugados de maitansinoide-anticuerpo en este modelo demostró la acumulación de fosfohistona dependiente de la dosis solo con la toxina DM4, no la toxina DM1. Otro estudio en este modelo mostró cierta inhibición del crecimiento tumoral por el conjugado no específico de 209-toxina. Estos resultados sugieren que es necesario evaluar otros modelos *in vivo*.

5

Estudio PK/PD con ADC de 5F9 en ratones portadores de tumores de 293-GCC n.º 2.

10

Un modelo tumoral alternativo usó células 293-GCC n.º 2. Se llevó a cabo un estudio PD para ADC de 5F9 en ratones portadores de tumores 293-GCC n.º 2. Se administraron a ratones dosis individuales de 5F9vcMMAF a 75 µg/kg o 150 µg/kg y se recogió suero en los puntos de tiempo desde 1 h hasta 4 días para los análisis PD de fosfohistona H3 para evaluar los efectos antimitóticos de la toxina en las células tumorales. Se detectó fosfohistona H3 mediante tinción de anticuerpo (Upstate Biotechnology, en la actualidad Millipore, Billerica, MA) de secciones de tumores incluidas en parafina. Los datos en la tabla 17 muestran que cada uno de los ADC provocó un aumento significativo en la población celular positiva para pH3 en los tumores, lo que indica que cada uno de ellos, a una dosis tanto de 75 como de 150 µg/kg equivalentes de toxina, tenía capacidad para alcanzar los tumores y tener el efecto antimitótico deseado en las células tumorales.

15

Tabla 17. Respuesta PD evaluada mediante la detención de las células en la mitosis (% de células tumorales positivas para pH3) después de una sola dosis iv de ADC de 5F9.

	% medio de células tumorales positivas para pH3	DT
Control de vehículo	2,556801	2,37707
5F9-vcMMAE 75 µg/kg 1h	4,525187	0,178882
4hr	2,551616	1,688255
8hr	4,243988	0,352938
24h	9,8199	4,82057
48hr	8,692061	4,756786
96hr	8,628345	1,065456
5F9-vcMMAE 150 µg/kg 1h	3,334943	1,351667
4hr	2,78543	1,690216
8hr	4,575611	1,130484
24h	13,78776	3,343155
48hr	14,26067	5,448921
96hr	14,67942	1,827724
5F9-vcMMAF 75 µg/kg 1h	4,235245	0,617585
4hr	4,18364	0,846752
8hr	4,930098	0,54746
24h	20,22484	2,453935
48hr	9,920771	3,788795
96hr	10,38187	1,896461
5F9-vcMMAF 150 µg/kg 1h	3,465674	1,341187
4hr	4,416646	0,807636
8hr	8,594385	4,005021
24h	21,53718	7,25212
48hr	15,15814	4,28407

(continuación)

	% medio de células tumorales positivas para pH3	DT
96hr	11,12288	2,150476
5F9-mcMMAF 75 µg/kg 1h	5,365582	1,14198
4hr	4,044478	0,992449
8hr	8,228597	3,098222
24h	14,10734	1,611093
48hr	19,37223	8,146504
96hr	7,749388	1,180759
5F9-mcMMAF 150 µg/kg 1h	3,212482	0,509604
4hr	4,722554	1,577531
8hr	9,105349	5,963128
24h	27,51416	10,96057
48hr	13,34043	3,414961
96hr	15,60917	3,386154

Estudios similares midieron los niveles de fosfohistona en ratones portadores de tumores 293-GCC n.º 2 tratados con 5F9vcMMAF, 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1. Se administró a los ratones dosis individuales a 150ug/kg y se recogió suero en los puntos de tiempo desde 1 h hasta 21 días para el análisis PK tanto de anticuerpo total como de anticuerpo conjugado a toxina. El porcentaje de células positivas a fosfohistona H3 en tumores de 293-GCC n.º 2 aumentó en respuesta a los tres ADC: 5F9vcMMAF, 5F9-SMCC-DM1 y 5F9-SPDB-DM4. Los niveles de fosfohistona H3 máximos estaban aumentados de 3 a 5 veces respecto del nivel basal, con picos a las 24 horas después de la inyección.

10 *Estudio de eficacia con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores s.c. de 293-GCC n.º 2*

Se ensayó la eficacia de 5F9-SPDB-DM4, 5F9-SMCC-DM1 y 5F9vcMMAF en el modelo de tumor de 293-GCC n.º 2 a dos dosis (75 µg/kg y 150 µg/kg de toxina), con una pauta q14d x 5. Específicamente, este estudio incluyó el control tratado con vehículo, Sc209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq), 5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), 5F9-DM4 (75 µg/kg DM4 eq), 5F9-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq) y 5F9-vcMMAF (75 µg/kg MMAF eq). Se usaron ratones portadores de células 293-GCC n.º 2 hembra de Taconic (10 ratones por grupo).

20 La figura 1 representa el crecimiento tumoral en ratones SCID portadores de 293-GCC n.º 2 tratados con 5F9vcMMAF, -DM1 y -DM4 en una pauta q14d. Se observó eficacia dependiente de la dosis con 5F9-SPDB-DM4 en el modelo 293-GCC n.º 2, mientras que el control de 209-SPDB-DM4 no tuvo efecto. 5F9-SMCC-DM1 también fue eficaz, aunque menor que 5F9-SPDB-DM4 a 150ug/kg. 5F9vcMMAF (75ug/kg y 150ug/kg) fue el más eficaz, aunque 209vcMMAF también tuvo cierto grado de actividad. Por lo tanto, a estas dosis y con estas pautas, 5F9-SPDB-DM4 tuvo el mayor diferencial de eficacia respecto de su conjugado de control.

25 *Estudio de eficacia con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores s.c. de 293-GCC n.º 2*

30 Se evaluaron 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1 respecto de su eficacia en el modelo de tumor de 293-GCC n.º 2 a dos dosis (75ug/kg y 150ug/kg de toxina) con una pauta q7d x 5. Específicamente, este estudio incluyó el control tratado con vehículo, 5F9 solo (15 µg/kg), DM1 (300 mg/kg), DM4 (300 mg/kg), Sc209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq), 5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM4 (150 mg/kg DM4 eq) y 5F9-DM4 (75 µg/kg DM4 eq). Se usaron ratones portadores de células 293-GCC n.º 2 hembra de Taconic (10 ratones por grupo).

35 *Estudio de eficacia con conjugados de auristatina en tumores 293 GCC n.º 2*

40 Se trataron ratones SCID portadores de tumores 293 GCC n.º 2 con conjugados de 5F9 con vc MMAE, vcMMAF o mcMMAF a tres dosis en comparación con conjugados de 209 de estas toxinas o con tres toxinas libres o control de vehículo. Las dosis se administraron iv con una pauta q7d x 4. Los tumores se recogieron en los días 3, 7, 10, 13 y 17. Los tumores en los ratones tratados con reactivos de control demostraron un aumento continuo del volumen. Los

tumores tratados con conjugados de 5F9-auristatina mostraron inhibición dependiente de la dosis y el tiempo de este crecimiento tumoral. La tabla 18 proporciona un resumen de los resultados (TGI=inhibición del crecimiento tumoral, T/C=tratamiento/control, TGD=retraso del crecimiento tumoral, CR/PR=respuesta completa/respuesta parcial; valor de p =medida para valorar la significación estadística, NS=no significativo).

5

Tabla 18. Análisis de los ADC de auristatina en ratones portadores de tumores 293 GCC n.º 2.

Grupos	TGI	T/C	TGD	CR/PR	Valor de p
209-vcMMAE 300 µg/kg	24,5	0,76	0,9	0	0,38>0,05 NS
209-vcMMAF 150 µg/kg	29,4	0,71	1,4	0	0,27>0,05 NS
209-mcMMAE 150 µg/kg	36,5	0,63	1,4	0	0,15>0,05 NS
MMAE libre 300 µg/kg	35,6	0,64	2	0	0,18>0,05 NS
mcMMAF libre 150 µg/kg	-3,4	1,03	-1,3	0	0,73>0,05 NS
5F9-vcMMAE 300 µg/kg	96,9	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-vcMMAE 150 µg/kg	83,5	0,17		2/10 PR	<0,01
5F9-vcMMAF 150 µg/kg	97	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-mcMMAF 150 µg/kg	97	0,03		9/10 PR	<0,001
5F9-vcMMAE 75 µg/kg	54,5	0,45	4,4		0,01<p<0,05
5F9-vcMMAF 75 µg/kg	88,5	0,12		6/10 PR	<0,001
5F9-mcMMAF 75 µg/kg	87,5	0,13		7/10 PR	=0,001
5F9-vcMMAF 37,5 µg/kg	65,2	0,35	7,1		=0,01
5F9-mcMMAF 37,5 µg/kg	63,6	0,36	5,8		=0,01

Los tres ADC fueron eficaces en el modelo de 293 GCC n.º 2 con una pauta q7d. 5F9-vcMMAF y 5F9-mcMMAF son más potentes que 5F9-vcMMAE, que se correlaciona con los datos de PD *in vivo* (pHisH3) y de citotoxicidad *in vitro*.

10

Estudio de eficacia con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores s.c. de T84

Se evaluaron 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1 respecto de su eficacia en el modelo de tumor de T84 a dos dosis (75ug/kg y 150ug/kg de toxina) con una pauta q7d x 5. Específicamente, este estudio incluyó el control tratado con vehículo, 5F9 solo (15 mg/kg), DM1 (300 µg/kg), DM4 (300 mg/kg), Sc209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), Sc209-DM4 (150 µg/kg DM4 eq), Sc209-vcMMAF (150 mg/kg MMAF eq), 5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 eq), 5F9-DM4 (150 µg/kg DM4 eq) y 5F9-DM4 (75 µg/kg DM4 eq). Se usaron ratones portadores de células T84 hembra de Taconic (10 ratones por grupo).

15

Inmunohistoquímica

La detección y medición de las cantidades relativas de GCC en tejidos, tales como biopsias y xenoinjertos, puede llevarse a cabo mediante inmunohistoquímica. Se fijan secciones de tejido congeladas en una solución 1:1 de acetona y metanol durante 20 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavan en 1 x PBS durante 5 minutos. Los portaobjetos se procesaron con un dispositivo de tinción automático, tal como el dispositivo de tinción automático Ventana Discovery XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando el tampón de reacción sugerido por el fabricante. Los anticuerpos anti-GCC se diluyen a 5 µg/ml en suero de cabra al 5 %. Para los anticuerpos humanos anti-GCC, por ejemplo, 5F9, la detección del anticuerpo secundario es una solución 1:500 de anticuerpo de cabra anti-humano biotilado en bloqueador de proteínas Dako (Dako, Carpintería, CA). Después de que el dispositivo de tinción automático procesase la reacción de anticuerpo, se retiran los portaobjetos del dispositivo de tinción automático, se enjuagaron en tampón de reacción, se deshidrataron a través de una serie convencional hasta xileno puro y se colocaron cubreportas con un medio de montaje a base de xileno.

25

30

Estudio de eficacia de ADC en un modelo de tumor primario

Se desarrollan modelos de carcinoma colorrectal primario y de cáncer gástrico como tumores subcutáneos en ratones. Se ensayan los ADC 5F9-vcMMAE y 5F9-mcMMAF en ratones portadores de tumores primarios PHTX-11c. Se administran dosis iv con una pauta q7d x 4. Se administran a los ratones de control conjugados de toxinas con 209.

35

Actividad antitumoral de ADC en un modelo de tumor primario

40

Se llevaron a cabo dos estudios similares para determinar la actividad antitumoral in vivo de 5F9-vcMMAE y para comparar la actividad antitumoral de 5F9-vcMMAE a toxina MMAE libre y a conjugado de anticuerpo-toxina con vcMMAE no inmunitario (209-vcMMAE) en ratones con xenoinjerto de tumor primario de colon PHTX-9c a varias dosis y pautas posológicas para determinar la cinética de recrecimiento después del tratamiento. Se inoculó a ratones CB-17 SCID (ocho semanas de edad) por vía subcutánea (SC) en el flanco con fragmentos de tumor PHTX-9c (2 mm x 2 mm). El crecimiento tumoral se monitorizó dos veces a la semana usando calibres vernier y se calculó el volumen tumoral medio usando la fórmula $(0,5 \times [\text{largo} \times \text{ancho}^2])$. Cuando el volumen tumoral medio alcanzó aproximadamente 150 mm³ (Estudio A) o 160 mm³ (Estudio B), se asignaron los animales aleatoriamente a grupos de tratamiento (n = 10/grupo para el estudio A y n = 9/grupo para el estudio B).

Se trató a los ratones (Estudio A) con una pauta posológica de una vez a la semana (QW) (3 dosis) con 0,938, 1,875, 3,75 o 7,5 mg/kg de 5F9-vcMMAE por vía intravenosa (IV) durante 20 días o controles, que incluyeron vehículo (suero salino al 0,9 %), 0,075 o 0,15 mg/kg de MMAE IV con una pauta QW o 1,875 o 3,75 mg/kg de 209-vcMMAE IV con una pauta QW durante 20 días. En el segundo estudio (Estudio B), se trató a los ratones con 0,938, 1,875, 3,75, 7,5 o 10,0 mg/kg de 5F9-vcMMAE IV con una pauta QW (3 dosis) o 3,75 mg/kg IV con una pauta de dos veces a la semana (BIW) (6 dosis) o controles que incluían vehículo, 7,5 o 10 mg/kg de 209-vcMMAE o 0,135 o 0,18 mg/kg de MMAE administrado por vía IV con una pauta QW durante 20 días. Las dosis se administraron en los días 1, 8 y 15 para la pauta QW y en los días 1, 4, 8, 11, 15 y 18 para la pauta BIW. La dosis de MMAE libre se calculó para que coincidiese con la cantidad de MMAE en las dosis de inmunoc conjugado siguiendo el siguiente análisis: La dosis equivalente de MMAE es un 1,8 % de la dosis de MLN0264. La dosis equivalente de enlazador + MMAE es un 4 % de la dosis de 5F9-vcMMAE. Estos cálculos se basan en una media de 3,9 moléculas de MMAE por anticuerpo y un peso molecular del anticuerpo libre de 150 kD. El peso molecular real del anticuerpo variará ligeramente debido al grado de glucosilación.

Se midieron el volumen tumoral y el peso corporal dos veces a la semana y se continuó más allá del periodo de tratamiento para medir la cinética de recrecimiento, evidenciada por el retraso del crecimiento tumoral (TGD). Se continuaron efectuando mediciones del volumen tumoral hasta que el volumen tumoral alcanzó un 10 % del peso corporal en un solo ratón en un grupo de tratamiento, momento en el cual se terminó el grupo. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral (TGI) $[(\text{volumen tumoral medio del grupo de control} - \text{volumen tumoral medio de un grupo tratado}) / \text{volumen tumoral medio del grupo de control}] \times 100$ en el día 20. Se compararon las relaciones de T/C a lo largo de un grupo de tratamiento con las relaciones de T/C del grupo de control usando una prueba de la t de Welch de dos colas. Debido a que el grupo completo se termina si un tumor alcanza el límite de tamaño (aprox. 1000 mm³), no se pudo calcular a TGD para los grupos donde el recrecimiento medio era lento.

Las diferencias en las tendencias de crecimiento tumoral con el paso del tiempo entre pares de grupos de tratamiento se evaluaron usando modelos de regresión lineal de efectos mixtos. Estos modelos tienen en cuenta el hecho de que cada animal se midió en múltiples puntos de tiempo. Se ajustó un modelo separado para cada comparación y se calcularon las áreas bajo la curva (ABC) para cada grupo de tratamiento usando los valores predichos del modelo. Después, se calculó el porcentaje de reducción de la ABC (dABC) en relación con el grupo de referencia. Un valor de *P* estadísticamente significativo (< 0,05) sugiere que las tendencias con el paso del tiempo para los dos grupos de tratamiento fueron diferentes. Los resultados se resumen en las tablas 19 y 20, a continuación.

Se observó actividad antitumoral en todos los grupos tratados con 5F9-vcMMAE en ambos estudios y se demostró que el efecto de la dosis era dependiente de la dosis. Los resultados de los dos estudios fueron comparables. En ratones tratados con 5F9-vcMMAE a 0,938 mg/kg, IV con una pauta QW, la TGI fue del 20,7-21,4 %, el valor de *p* fue <0,05 en comparación con el grupo de vehículo. En el grupo tratado con 1,875 mg/kg administrado por vía IV, con una pauta QW la TGI fue del 41,3-44,7 %, el valor de *p* fue del <0,001. En el grupo tratado con 3,75 mg/kg administrado por vía IV, con una pauta QW la TGI fue del 65,3-65,7 % (*p* <0,001) en comparación con el grupo de vehículo. 5F9-vcMMAE administrado a 7,5 mg/kg IV QW proporcionó una TGI del 84,1-84,3 % (*p* <0,001) y 10 mg/kg IV QW (solo Estudio B) proporcionó una TGI del 91,2 % (*p* <0,001). Cuando se administró 3,75 mg/kg IV con una pauta BIW (S), se observó una inhibición significativa con una TGI del 84,9 % (*p* <0,001).

Se observó una actividad antitumoral moderada a las dosis más elevadas de 209-vcMMAE de 7,5 y 10,0 mg/kg con una TGI del 35,7 y el 45,4 %, respectivamente (*p* <0,001) pero las dosis bajas de 209-vcMMAE (1,875 y 3,75 mg/kg) no mostraron inhibición (*p* >0,05). La actividad antitumoral observada con la alta dosis de 209-vcMMAE probablemente se debe a la actividad no específica por la porción de MMAE del inmunoc conjugado.

La administración de toxina MMAE libre proporcionó resultados mixtos: 0,075, 0,135 y 0,15 mg/kg administrados IV QW no proporcionaron inhibición del crecimiento tumoral (*p* >0,05) pero la administración de 0,18 mg/kg IV QW dio como resultado una TGI del 50,4 % (*p* <0,001).

La máxima pérdida de peso corporal observada durante el periodo de tratamiento fue del 2,3 % en el día 7 en el grupo de toxina libre MMAE a 0,18 mg/kg del Estudio B y el grupo de 0,938 mg/kg de 5F9-vcMMAE del mismo estudio. Esto indica que el fármaco se toleró bien.

Se continuó efectuando mediciones del volumen tumoral más allá del periodo de tratamiento hasta que el volumen tumoral alcanzó un 10 % del peso corporal en un solo ratón en un grupo de tratamiento y después se terminó el grupo de tratamiento. En estos estudios, el recrecimiento tumoral pareció ser dependiente de la dosis.

5

Tabla 19. Resultados del Estudio A de xenoinjertos de tumor de colon humano primario en ratones SCID.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Método de administración/frecuencia	TGI	Cambio de BW (porcentaje máximo medio)	TGD (días)/(o días hasta el primer tumor >1000 mm ³)
Vehículo	0	IV QW x 3 dosis	N/A	-0,2	0
209-vcMMAE	1,875	IV QW x 3 dosis	-2,0 (p>0,05)	8,3	0,6
209-vcMMAE	3,75	IV QW x 3 dosis	4,5 (p>0,05)	6,9	0,4
MMAE	0,075	IV QW x 3 dosis	5,0 (p>0,05)	8,3	1,0
MMAE	0,15	IV QW x 3 dosis	11,1 (p>0,05)	10,8	2,0
5F9-vcMMAE	0,938	IV QW x 3 dosis	21,4 (p>0,05)	9,0	3,3
5F9-vcMMAE	1,875	IV QW x 3 dosis	44,7 (p>0,001)	10,6	8,2
5F9-vcMMAE	3,75	IV QW x 3 dosis	65,3 (p>0,001)	9,0	17,8
5F9-vcMMAE	7,5	IV QW x 3 dosis	84,1 (p>0,001)	7,5	(>58 días hasta primer tumor)

Tabla 20. Resultados del Estudio B de xenoinjertos de tumor de colon humano primario en ratones SCID.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Método de administración/frecuencia	TGI	Cambio de BW (porcentaje máximo medio)	TGD (días)/(o días hasta el primer tumor >1000 mm ³)
Vehículo	0	IV QW x 3 dosis	N/A	-1,8	0
209-vcMMAE	7,5	IV QW x 3 dosis	35,7 (p>0,001)	4,2	4,2
209-vcMMAE	10,0	IV QW x 3 dosis	45,4 (p>0,001)	2,6	11,3
MMAE	0,135	IV QW x 3 dosis	2,2 (p>0,05)	9,3	0,2
MMAE	0,18	IV QW x 3 dosis	50,4 (p>0,001)	-2,3	8,6
5F9-vcMMAE	0,938	IV QW x 3 dosis	20,7 (p>0,001)	-2,3	3,8
5F9-vcMMAE	1,875	IV QW x 3 dosis	41,3 (p>0,001)	5,6	6,6

(continuación)

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Método de administración/frecuencia	TGI	Cambio de BW (porcentaje máximo medio)	TGD (días)/(o días hasta el primer tumor >1000 mm ³)
5F9-vcMMAE	3,75	IV QW x 3 dosis	65,7 (p>0,001)	-2,2	16
5F9-vcMMAE	3,75	IV BIW x 6 dosis	84,9 (p>0,001)	-1,8	31,9
5F9-vcMMAE	7,5	IV QW x 3 dosis	84,3 (p>0,001)	6,5	(>47 días hasta primer tumor)
5F9-vcMMAE	10,0	IV QW x 3 dosis	91,2 (p>0,001)	7,2	(>56 días hasta primer tumor)

Estudio piloto de eficacia con anticuerpo anti-hGCC 5F9 desnudo en el modelo de CT26 hGCC/luc n.º 32 diseminado (ratones balb/c)

5 Este modelo evalúa la capacidad de los anticuerpos desnudos para unirse a células tumorales que expresan GCC en la circulación y prevenir el establecimiento de nuevos tumores. Se inoculó a ratones balb/c por vía i.v. con células CT26 hGCC/luc n.º 32 a razón de 1×10^5 /ratón y 5×10^5 /ratón. Se administraron vehículo de NaCl al 0,9 % y anticuerpo no específico (209 desnudo) a los grupos de control por comparación con la administración de 5F9 desnudo. Se modificaron por ingeniería genética ambos anticuerpos (en el vector pLKTOK58) para que tuviesen un isotipo IgG1, de tal forma que sus regiones Fc pueden provocar una respuesta de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo después de su unión a antígenos de la superficie celular (es decir, GCC para 5F9 y una diana no relacionada para 209). La dosificación se inició un día antes de la inoculación por vía i.v., con una pauta posológica de una vez a la semana por vía i.v. x4 (q7d x 4). El crecimiento tumoral se monitorizó dos veces a la semana con el sistema de obtención de imágenes Xenogen. También se monitorizaron el peso corporal y la supervivencia dos veces a la semana. Se registraron el peso pulmonar e imágenes que incluyen imágenes por IRM al final de este estudio.

20 Como se muestra en la figura 2, ambos grupos de 5F9 (40 mg/kg y 10 mg/kg; 1×10^5 /ratón) muestran eficacia (en el día 34p.i. la T/C (tratamiento/control) es de 0,04 a 0,05). La T/C para el grupo de 5F9 es de 0,18 a 0,14 en el día 34p.i. en comparación con el grupo de 209. La T/C para el grupo de 40 mg/kg de 209 es de 0,64 en comparación con el grupo de NaCl al 0,9 % (suero salino normal). No se observó beneficio con 5F9 en los grupos de 5×10^5 .

25 El peso pulmonar de cada grupo al final de este estudio se muestra en la figura 3. Prueba de la t: vehículo frente a 40 mg/kg de 209 P=0,4; vehículo frente a 40 mg/kg de 5F9 P<0,05; vehículo frente a 10 mg/kg de 5F9 P<0,01. La inspección visual de los pulmones confirmó menos nódulos tumorales en los grupos tratados con 5F9 que en los grupos de vehículo o tratados con 209. La IRM *in vivo* de los ratones mostró una exfiltración masiva de tumor pulmonar a los tejidos circundantes y desplazamiento cardíaco en los ratones tratados con vehículo. En un ratón tratado con 40 mg/kg de 5F9, se observó presentación pulmonar normal sin evidencias de tumor.

30 Se muestra una muestra de supervivencia en la figura 4. Se observó un aumento significativo en la supervivencia con los grupos tratados con 5F9 (1×10^5) y no hubo una diferencia entre los grupos de 10 y 40 mg/kg de 5F9.

EJEMPLO 4: Generación de una línea celular productora de anticuerpo

35 Para generar un clon de una línea celular CHO estable que expresa 5F9 con una productividad > 600 mg/l, se generaron vectores de expresión para 5F9 subclonando la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 19) y la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 17) en el vector de expresión pLKTOK58, que contiene Fc de IgG1 humana de TS y el gen de resistencia a neomicina. La expresión del producto de fusión de región variable de 5F9-IgG1 se encuentra bajo el control del promotor EF-1a.

40 *Clonación y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal humano 5F9 anti-GCC*

45 El ARN total se aisló (kit RNeasy de Qiagen) del hibridoma humano 46.5F9, subclón 8.2. Este hibridoma porta la región constante Kappa publicada "estándar" de la cadena ligera (n.º de registro de GenBank AW383625 o BM918539) y la región constante de IgG2 publicada "estándar" de la cadena pesada (n.º de registro de GenBank BX640623 o AJ294731). Se sintetizó ADNc con cola de poli-G listo para race 5' mediante métodos tradicionales (Nature Methods 2, 629-630 (2005)). La región variable de cadena ligera se amplificó mediante la PCR a partir de ADNc mediante race 5' usando un oligo de anclaje de poli-C en combinación con un cebador inverso específico para la región constante Kappa. La región variable de cadena pesada se amplificó con un cebador inverso específico para la región constante de IgG2 en múltiples combinaciones con cebadores directos para las secuencias líder de cadena pesada conocidas.

Los productos de la PCR se clonaron mediante TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) y se secuenciaron con los cebadores M13F y M13R.

Construcción de vectores de expresión de mamífero que portan el anticuerpo monoclonal humano anti-GCC 5F9

5 Se construyeron vectores de expresión de mamífero que portan las regiones variables ligeras y pesadas de 5F9 para generar líneas celulares CHO de producción. Para la construcción nativa, se subclonaron las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de 5F9 en pLKTOK58D (Solicitud de Patente de los Estados Unidos n.º 20040033561). Este vector porta dos marcadores de selección de mamífero: resistencia a neomicina y DHFR/metotrexato (para la
10 amplificación). El vector permite la coexpresión de las cadenas tanto ligeras como pesadas a partir de los promotores en tándem de EF1 alfa, ubicados cada uno cadena arriba de las regiones constantes líder-Kappa y líder-constantes de IgG1 (Fc de tipo silvestre) del vector. Para la subclonación, se amplificaron por la PCR las regiones variables de las cadenas ligera y pesada a partir de clones TOPO con secuencia confirmada con cebadores de genes específicos que contenían sitios de restricción únicos para la clonación direccional en las uniones de las regiones líder-Kappa y
15 líder-IgG1 del vector. Las secuencias de los cebadores son las siguientes (las secuencias específicas para la región variable de 5F9 con la fuente en negrita):

Cebadores de líder-variable de cadena ligera de 5F9:

20 directo NotI

**5'ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACA
GCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTG-3'**

(SEQ ID NO: 234)

inverso BsiWI
25 5-**GCCACCGTACGTTTGATTCCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC-3'** (SEQ ID NO: 235)

Cebadores de líder-variable de cadena pesada de 5F9

30 directo EcoRI
5'**ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCC
CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGAC-3'** (SEQ ID NO: 236)

inverso BlnI
35 5-**GGAGGCTGAGCTGACGGTGACCAGGGTCCCTGGCCCCAGTGGTC-3'** (SEQ ID NO: 237)

Los clones se confirmaron mediante secuenciación de ADN bicatenario de las cadenas tanto ligeras como pesadas.

40 Se usaron dos métodos de transfección para introducir las construcciones en células CHO: el proceso MPI tradicional y el proceso de Crucell. Las transfecciones de células CHO se iniciaron con la construcción 5F9 nativa usando el proceso de MPI tradicional. Se usaron ADN linealizados y no linealizados, con o bien electroporación o transfección con Lipofectamine 2000 CD. Se generaron aproximadamente 30 grupos estables mediante selección en G418, medio sin nucleósidos y metotrexato 5 nM. Basándose en el análisis de FMAT de los niveles de producción de anticuerpo, se seleccionaron tres grupos estables para la clonación. El grupo con la máxima producción secretó anticuerpo a
45 12,2ug/ml. Estos tres grupos se han congelado.

Pueden evaluarse los elementos STAR de Crucell para producir vectores de expresión de 5F9 que contienen un elemento STAR.

La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de 5F9/hIgG1 es:

50

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCC
 ACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCTTTCAGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAACACCAACGACAACCCGTCCT
 TCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTC
 TGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAAC
 TTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGG
 TCTTCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT
 CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT
 GCACACCTTCCCGGTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTG
 CCCTCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACC
 AAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCA
 GCACCTGAATCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCCTCA
 TGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGG
 TCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAA
 TGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCAT

 CTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGA
 GCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC
 GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGAC
 TCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG
 AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT
 CCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATACTAGAG

(SEQ ID NO: 230)

5 La secuencia de proteína de la cadena pesada de 5F9/hlgG1 es;

MGWSCILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCVFGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLE
 WIGEINHRGNTNDNPSLKSRTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQ
 GTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQS
 SGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKHTHTCPPAPELLGGPSVFLFP
 PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
 HQDWWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

(SEQ ID NO: 231)

10 La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera 5F9/hKappa es:

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGT
CCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCC
ACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTG
GCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTT
CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCCTCCTCACCATCGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTT
GCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAACGTGG
AAATCAAACGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAG
TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACAC
AAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

(SEQ ID NO: 232)

5 La secuencia de proteína de la cadena ligera 5F9/hKappa es:

MGWSCILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQKPGQAPRLLI
YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDFAVYYCQYKTPRTEFGQGTNVEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSK
ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO: 233)

10 Las secuencias de ácido nucleico de cadena pesada y ligera para 5F9 se insertaron en el vector pTOK58D:

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgtgacgcagctctccagccacc
ctgtctgtgtctccagg

ggaaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtgttagcagaaacttagcctggatcagcagaaacctggccagg

ctcccaggetcctcatctatggatcaccagggccactggaatcccagccaggttcagtgccagtggtctgggaca

gagttcactctcaccatcggcagcctgcagctgaagattttgcagtttactgtcagcagtataaacctggcctcg

gacgttcggccaagggaccaacgtggaaatcaaactgacgggtgctgaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatg

agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaag

gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcag

cagcacctgaccctgagcaaaagcagactacgagaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcagggcctgagct

cgcccgtcacaagagcttcaacaggggagagtgtag

15 (SEQ ID NO: 308)

ES 2 788 457 T3

atgggatggagctgtatcatcctcttcttgtagcaacagct
acagggtgccactcccaggtgcagctacagcagtgggggcgcaggactgttgaagccttcggagacctgtccctcacctg
cgctgtctttggtgggtctttcagtggtfactactggagctggatccgccagccccagggaaggggctggagtggattg
gggaaatcaatcatcgtggaacaccaacgacaaccgctccctcaagagtcgagtcaccatatcagtagacacgtccaag
aaccagttgcctgaagctgagttctgtgaccgccgggacacggctgtttactgtgagagagaacgtggatacac
ctatggtaactttgaccactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggccatcggtcttcc
ccctggcaccctctccaagagcacctctgggggcacagcggcctgggctgcctggtaaggactacttccccgaaccg

gtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtctcaggactcta
ctccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaactgaaatcacaagccca
gcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaatcttgtgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaa
ctcctggggggaccgtcagttctcttcccccaaaaccaaggacacctcatgatctcccggaccctgaggtcac
atgctgtggtggacgtgagccacgaagacctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatg
ccaagacaaagccgcgggaggagcagtaaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtctgcaccaggactgg
ctgaaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaagccctcccagccccatcgagaaaacctctcaaaagccaa
agggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagacc
acgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggg
gaactcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggta
aataa

5

(SEQ ID NO: 309)

Las secuencias que codifican las cadenas pesadas y ligeras de Abx-229 a continuación se insertaron en el vector pTOK58D:

10

atggagtttgggctgagctggcttttctgtggctatt
ttaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctggggggctccctgagactctc
ctgtgcagcctctggattcaccttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccaggaaggggctggagtggg
tctcaggtattagtgggagtggtggtaggacatactacgcagactcctgaagggccggtcaccatctccagagacaat
tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtgcgaaagatcgga
ttttggagtgggtccatttgactactggggccaggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaagggcccatcgg
tcttccccctggcacctcctccaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgctgtgcaaggactacttccc
gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctacagtcctcagg
actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcaca
agcccagcaaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctga

ggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagtcaactggtacgtggacggcgtggaggtgc
ataatgccaaagacaaaagccgaggaggagcagtagacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
gactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctcccagccccatcgaaaaacctctccaa
agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcc
tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcagacatgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactac
aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggca
gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctc
cgggtaataa

5

(SEQ ID NO: 310)

atgaggctccctgctcagcttctc
ttctctgctactctggctcccagataccactggagaaatagtgatgacgccgtctcagccaccctgtctgtgtctcc
aggggagagagccaccctctcctgcaggccagtcagagtgttagtagaaacttagcctggtaccagcagaaacctggcc
aggctcccaggtcctcatctatggtgcatccaccagggccactggatcccagccagggtcagtggaagtgggtctggg
acagaattcactctcaccatcagcagcctgcagtctgaagatgttgcagtttactgtcaccagtatagtaactggat
gtgcagttttggccaggggaccaagctggagatcaaactgacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctctg
atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtg
aaggtggataacgcctccaatcgggtaactcccaggagagtgctcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcct
cagcagcaccctgacctgagcaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcaccatcaggccctga

gctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag

(SEQ ID NO: 311)

5 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC. AMGEN BRITISH COLUMBIA

10 <120> MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ANTI-GCC Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

<130> M2051-7027WO

<140>

<141>

15 <150> 61/254.474
<151> 23/10/2009

<160> 319

20 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 348

25 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 1

caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc	60
acatgcaactg tctctggggt ctcattaagc agaaatgcta taagctgggt tcgccagcca	120
ccaggaaagg gtctggagtg gcttgagta atatggactg gtggaggcac aaattataat	180
tcagctctca aatccagact gagcatccgc aaagagaact ccaagagtca agttttctta	240
aaaatgaaca gtctacaaac tgaagacaca gccaggtact tctgtgccag aagtggttac	300
gacgggtttg attactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca	348

35 <210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

ES 2 788 457 T3

<400> 4

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Thr Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

5

<210> 5
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15

<400> 5

caggtccagt tgaagcagtc tggagctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
tcttgcaagg cttctggcta caccttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggtcctc gaagtggtaa tacttactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcgtccag cacagcctac 240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300
gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctct 336

20

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 6

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

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

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

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

5

<210> 7

<211> 336

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15

<400> 7

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcgggta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gaggcctctta tatagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttacaacaga ggcttgcca ggctccaaag cacctaattgt atcaggtgtc caaactggac 180

cctggcatcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaag 336

20

<210> 8

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 8

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

5 <210> 9
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 9

cagggtccaac	tg	cagcagcc	tggggctgaa	ctggtgaagc	ctggggcttc	agtcagatg	60
tcttgtaagg	cttctggcta	tattttcacc	ggctactgga	tgtactgggt	gaagcagagg	120	
cctggccaag	gccttgagtg	gattggaagg	attcatcctt	ctgatagtaa	tactaactac	180	
aatcaaaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240	
atgcaactca	gcagcctgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtac	ccatgccctt	300	
gcttactggg	gccaagggac	tctggtcaact	gtctct			336	

15 <210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 10

ES 2 788 457 T3

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

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

Trp Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

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

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

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

Thr His Ala Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

100

105

110

5 <210> 11
 <211> 333
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 11

gatgttggtg tgaccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctct 60
 atctcttgca agtcaagtca ggcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgagttgg 120
 ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaactct atctggtgtc tcaactggac 180
 tctggagtcc ctgacagggt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaagatc 240
 agcagagtgg aggctgagga tttgggagtg tattactgcg tgcaagggtac acatttattc 300
 acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 333

15 <210> 12
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 12

ES 2 788 457 T3

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

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

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

5 <210> 13
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 13

cagggtccagc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca gactactata taaactgggt gaagcagagg 120
 cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggtccta gaagtggtag tacttactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatgggat 300
 gcttactggg gccaaaggac tctggtcact gtctctgca 339

15 <210> 14
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 14

ES 2 788 457 T3

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

Ala

5 <210> 15
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 15

```

gatgttgtga tgaccagac tccactgtct ttgtcgggta ccattggaca accagcctct      60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaagacata tttgaattgg      120
ttacaacaga ggcctggcca ggctccaaag cacctaattg atcaggtgtc caaactggac      180
cctggcatcc ctgacagggt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc      240
agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaagggtac atattatccg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa                                  336
  
```

15 <210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 16

ES 2 788 457 T3

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

5 <210> 17
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 17

cagggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat cggccagccc 120
 ccaggaaggg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300
 tacacctatg gtaactttga ccaactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

15 <210> 18
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 18

ES 2 788 457 T3

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ala Leu
 65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

5 <210> 19
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 19

```

gaaatagtga tgacgcagtc tccagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agaaacttag cctggtatca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggtcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcggcag cctgcagtct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggctcggac gttcggccaa      300
gggaccaacg tggaaatcaa a                                          321
    
```

15 <210> 20
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 20

ES 2 788 457 T3

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser Leu Gln Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys
 100 105

5 <210> 21
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 21

```

cagggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtcaagc ctggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactgctaca tgagctggat cgcaggctct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactacta gtggttaatac catttactac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggcctgtg attactgtgc gagagactgg      300
ggatggttct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca      357
    
```

15 <210> 22
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 22

ES 2 788 457 T3

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

5 <210> 23
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15 <220>
 <221> base_modificada
 <222> (216)..(217)
 <223> a, c, t, g, desconocida u otra

20 <400> 23

```

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc      60
atctcctgca agtctagtca ggcctcctg cataatgatg gaaagaccta tttgtattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctctgatct atgaagtttc caaccggttc      180
tctggagtgc cagatagggt cagtagcagc gggtcnngga cagatttcac actgaaaatc      240
agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct      300
cggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa                                  336
  
```

<210> 24
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (73)..(73)
 <223> Cualquier aminoácido

10 <400> 24

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

15 <210> 25
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 25

cagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	gtggtccagc	ctgggaggtc	cctgagactc	60
tctctgtcagc	cgtctggatt	caccttcagt	agctatggca	tgcactgggt	ccgccagget	120
ccaggcaagg	ggctggagtg	ggtggcagct	atatggtatg	atggaagtaa	taaatactat	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatc	tccagagaca	attccaagaa	cacgctgtat	240
ctgcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtgt	attactgtgc	gagagggagg	300
agcagctcgt	actttgacta	ttggggccag	ggaaccctgg	tcaccgtctc	ctca	354

25 <210> 26
 <211> 118
 <212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 27

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 27

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctctaattt ataagacttc taaccgcttc 180

tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg gagctgagga tgtcgggggt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca 300

20

accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa 333

<210> 28

<211> 111

ES 2 788 457 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 28

```

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

    Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
                                20                               25                               30

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

    Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
    50                               55                               60

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

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

    Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
    100                               105                               110
  
```

10 <210> 29
 <211> 354
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

20 <400> 29

```

    caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
    tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt cggccaggct      120
    ccaggcaagg ggctggagtg ggtgggagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat      180
    gcagcctccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
    ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtat tttactgtgc gagagggagg      300
    agcagctcgt attttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca              354
  
```

25 <210> 30
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

Gly Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31

<211> 333

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15

<400> 31

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60
atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagacttc taaccgcttc 180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcaggggtgg gagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca 300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa 333

20

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 32

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
20 25 30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105 110

10

<210> 33

<211> 354

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 33

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcaactgggt cgcaggct 120

ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagct atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagggagg 300

20

agcagctcgt actttgacta ttggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc ctca 354

<210> 34

<211> 118

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 788 457 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 34

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20           25           30

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

Ala Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

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

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

Ala Arg Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

```

5

<210> 35

<211> 333

<212> ADN

10

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15

<400> 35

```

gatattgtga tgaccagac tccactctcc tcacctgtca cccttgaca gccggcctcc      60
ttctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacgta cttgagttgg      120
cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctccctaattt ataagatttc taaccggttc      180
tctgggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcagggg cagatttcac actgaaaatc      240
agcaggggtgg aagctgagga tgtcgggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcca      300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaa                                     333

```

20

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 36

5

```

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

Gln Pro Ala Ser Phe Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
          20           25           30

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

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

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

Thr Gln Phe Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

<210> 37

<211> 363

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 37

15

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct      120

ccaggaaggg ggctggagtg gatttcatac attactagta gtggtagtag catatactac      180
tcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctactgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc      300
agtggctggt tgggagcca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc      360
tcg                                                                                   363
    
```

20

<210> 38

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 38

5

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ser Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val
50 55 60

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

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

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

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39

<211> 336

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 39

15

gatattgtga tgaccagac tccactctct ctgtccgtca ccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgta agtctagtca ggcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctctgatct atgaagtctt caaccggttc 180

tctggagtgc caaatagggt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttgggggt tattactgca tgcaaagtat acaacttacg 300

20

tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 40

<211> 112

ES 2 788 457 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 40

```

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
          50           55           60

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

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

Ile Gln Leu Thr Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100          105          110
    
```

10 <210> 41
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

20 <400> 41

```

gagggtgcagc tgttgaggatc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt cgcagggt      120
ccaggggaagg ggctggactg ggtctcagat attagtggtg gtggtggtag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatgc acagcctgag cgccgaggac acggccatat attactgtgc gaaacggcgg      300
tggcaggggt acttcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcaactgtctc ctca      354
    
```

25 <210> 42
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5 <400> 42

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
          35           40           45

Ser Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50           55           60

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

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

Ala Lys Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Arg Gly Thr
          100          105          110

Leu Val Thr Val Ser Ser
          115
    
```

<210> 43

10 <211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 43

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccaggca gcgtgttgac agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccgct cactttcggc      300
ggagggacca aggtggagat caaaa                                324
    
```

20

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 44

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

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

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

<210> 45

<211> 360

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 45

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggc cctgagactc 60

tectgtgcag cctctggatt cacctttagc cgctatgcc tgaactgggt ccgccaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggga gtggtggtag gacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactatat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300

gatttttga gtggtccatt tgactactgg ggccagggaa cctgggtcac cgtctcctca 360

20

<210> 46

<211> 120

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 46

5

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
          20           25           30

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

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

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

Ala Lys Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120
    
```

<210> 47

<211> 321

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 47

10

15

```

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct      240
gaagatdddg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttggccag      300

gggaccaagc tggagatcaa a                                          321
    
```

20

<210> 48

<211> 107

ES 2 788 457 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 48

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

10 <210> 49
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

20 <400> 49

caggtgcagc	tgcaggagtc	gggccagga	ctggtgaagc	cttcggagac	cctgtccctc	60
acctgcactg	tctctggtgg	ctccatcaga	agttactact	ggagctggat	ccggcagccc	120
gccgggaagg	gactggagtg	gattggacgt	atttatatca	gtgggaggac	caccttcaac	180
ccctccctca	agagtcgagt	caccatatca	gtggacacgt	ccaagaacca	gttctccctg	240
aagctgagct	ctgtgaccgc	cgcggaacag	gccgtgtatt	tctgtgcgag	agatagatat	300
tatggctacc	ttgactactg	gggccagggg	accctggtca	cogtctcctc	a	351

25 <210> 50
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 50

5

```

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Arg Ser Tyr
 20           25           30

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

Gly Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys
 50           55           60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65           70           75           80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys Ala
 85           90           95

Arg Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 100          105          110

Val Thr Val Ser Ser
 115
    
```

<210> 51

<211> 324

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 51

15

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc cgcagttact tagcctggta ccaacagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat gatgcatcca gcagggccac tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcacatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgag caccttcggc      300
caaggacac gactggagat taaa                                           324
    
```

20

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

5

<400> 52

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
85 90 95

Ser Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

10

<210> 53

<211> 342

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 53

caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggcgg ctccatccgt cactactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccaggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ctctccctca agagtcgagt caccatatca agagacacgt ccaagaatca ggtctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcggc ggggatgggc 300

20

tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 54

<211> 114

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 788 457 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 54

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

Ser Ser

5

<210> 55

<211> 321

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

15 <400> 55

gacatccaga tgaccagtc tccttctcc ctgtctgcat ctataggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca ggccattaga aatgatttag gctggtatca gctgaaaccg 120
 gggaaagccc ctaagcgcct gatctattct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaggattctg caacttatta ctgtctacag cataatagtt tcctccgac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 56

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

ES 2 788 457 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 56

```

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp
          20           25           30

Leu Gly Trp Tyr Gln Leu Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Leu Ile
          35           40           45

Tyr Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro
          85           90           95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

5

<210> 57

<211> 15

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15

<400> 57

agaaatgcta taagc

15

<210> 58

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 58

```

Arg Asn Ala Ile Ser
1           5

```

30

<210> 59

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 59
gtaatatgga ctggtggagg cacaaattat aattcagctc tcaaatcc 48

5 <210> 60
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 60

15 **Val Ile Trp Thr Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser**
1 5 10 15

<210> 61
<211> 24
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 61
agtggttacg acgggttga ttac 24

<210> 62
<211> 8
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 62

Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr
1 5

40 <210> 63
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 63
50 agtgccagct caagtgtaaa ttacatgcac 30

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <400> 64

ES 2 788 457 T3

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

5 <210> 65
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 65
gacacatcca aactggcttc t 21

15 <210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 66

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

25 <210> 67
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 67
cagcagtgga gtggaacctt gtagacg 27

40 <210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 68

Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

50 <210> 69
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 69
gactactata taaac 15

ES 2 788 457 T3

<210> 70
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 10 <400> 70

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

 <210> 71
 <211> 51
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

 <400> 71
 aagattggtc ctcgaagtg taatacttac tacaatgaga agtcaaggg c 51
 25 <210> 72
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

 <400> 72

Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

 35

 <210> 73
 <211> 12
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético
 45 <400> 73
 tgggatgctt ac 12

 <210> 74
 <211> 4
 50 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético
 55

Trp Asp Ala Tyr
1

ES 2 788 457 T3

5 <210> 75
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 75
 aagtcagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat attgaaat 48

15 <210> 76
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20 <400> 76

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

25 <210> 77
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 77
 caggtgtcca aactggacc t 21

40 <210> 78
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 78

Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

50 <210> 79
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55 <400> 79
 ttgcaaggta catattatcc gtacacg 27

60 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 80

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

10

<210> 81

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 81

ggctactgga tgtac

15

20

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 82

30

Gly Tyr Trp Met Tyr
1 5

35

<210> 83

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 83

aggattcatc cttctgatag taatactaac tacaatcaaa agtcaaggg c

51

45

<210> 84

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 84

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

55

Gly

<210> 85

ES 2 788 457 T3

<211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 85
 gcccttgctt ac 12

10

<210> 86
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 86

Ala Leu Ala Tyr
1

25

<210> 87
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 87
 aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaaaacct atttgagt 48

35

<210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 88

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

45

<210> 89
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 89
 ctggtgtctc aactggactc t 21

55

<210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60

ES 2 788 457 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 90

Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser
1 5

<210> 91
<211> 24
10 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 91

gtgcaaggta cacattatt cacg 24

<210> 92
20 <211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 92

Val Gln Gly Thr His Leu Phe Thr
1 5

30 <210> 93
<211> 15
<212> ADN
35 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 93

gactactata taaac 15

<210> 94
45 <211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50 <400> 94

Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

55 <210> 95
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 95
 aagattggtc ctagaagtgg tagtacttac tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 96
 <211> 17
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 96

Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

20 <210> 97
 <211> 12
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 97
 tgggatgctt ac 12

30 <210> 98
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 98

Trp Asp Ala Tyr
 1

45 <210> 99
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 99
 aagcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat 48

55 <210> 100
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 788 457 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 100

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu
1 5 10 15

5

<210> 101

<211> 21

<212> ADN

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15 <400> 101

caggtgtcca aactggacc t 21

<210> 102

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 102

Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

30 <210> 103

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 103

ttgcaaggta catattatcc gtacacg 27

40

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

45

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 104

50

Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 105

<211> 15

55 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 105
 ggttactact ggagc 15

5 <210> 106
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 106

Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

15

<210> 107
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 107
 gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccgtccc tcaag 45

<210> 108
 <211> 16
 30 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 108

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

40 <210> 109
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 109
 gaacgtggat acacctatgg taacttgac cac 33

50 <210> 110
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 110

60

ES 2 788 457 T3

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

5 <210> 111
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 111
 agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc 33

15 <210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 112

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

25 <210> 113
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 113
 ggtgcatcca ccaggccac t 21

40 <210> 114
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 114

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

50 <210> 115
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 115
 cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

ES 2 788 457 T3

5 <210> 116
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10 <400> 116

Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

15 <210> 117
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 117
 gactgctaca tgagc 15

25 <210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 118

Asp Cys Tyr Met Ser
1 5

35 <210> 119
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45 <400> 119
 tacattacta ctagtggtaa taccatttac tacgcagact ctgtgaaggg c 51

50 <210> 120
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55 <400> 120

ES 2 788 457 T3

Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

5 <210> 121
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 121
 gactggggat ggttctacgg tatggacgtc 30

15 <210> 122
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 122

Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

25 <210> 123
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 123
 aagtctagtc agagcctcct gcataatgat ggaaagacct atttg 45

40 <210> 124
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 124

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

50 <210> 125
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 125
 gaagttcca accggtctc t 21

5 <210> 126
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 126

Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

15

<210> 127
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 127
 atgcaaagta tacagctcc tcggacg 27

<210> 128
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 128

Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Arg Thr
1 5

40 <210> 129
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 129
 agctatggca tgcac 15

50 <210> 130
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <400> 130

ES 2 788 457 T3

Ser Tyr Gly Met His
1 5

5 <210> 131
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 131
 gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtaaggg c 51

15 <210> 132
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 132

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

25 <210> 133
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 133
 gggaggagca gctcgactt tgactat 27

40 <210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 134

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

50 <210> 135
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 788 457 T3

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 135
 5 aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt 48

<210> 136
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 136
 15

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

<210> 137
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 137
 25 aagacttcta accgcttctc t 21

<210> 138
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 138
 35

		Lys	Thr	Ser	Asn	Arg	Phe	Ser
		1				5		

<210> 139
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 139
 45 atgcaagcta cgcaatttcc aacc 24

<210> 140
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 140
 55

60

ES 2 788 457 T3

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

5 <210> 141
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 141
agctatggca tgcac 15

15 <210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 142

Ser Tyr Gly Met His
1 5

25 <210> 143
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 143
gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagcct ccgtgaaggg c 51

40 <210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 144

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

50 <210> 145
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 145
 gggaggagca gctcgattt tgactac 27

5 <210> 146
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 146

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

15 <210> 147
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 147
 aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt 48

30 <210> 148
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 148

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

40 <210> 149
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 149
 aagacttcta accgctctc t 21

50 <210> 150
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 150

Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

60

ES 2 788 457 T3

5 <210> 151
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 151
 atgcaagcta cgcaattcc a 21

15 <210> 152
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 152

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

25 <210> 153
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 153
 agctatggca tgcac 15

40 <210> 154
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 154

Ser Tyr Gly Met His
1 5

50 <210> 155
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 155
 gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

60 <210> 156
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 156

Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

10 <210> 157
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 157
 gggaggagca gctcgactt tgactat 27

20 <210> 158
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 158

Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

30 <210> 159
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 159
 aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacgt acttgagt 48

45 <210> 160
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 160

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

55 <210> 161

ES 2 788 457 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 161
 aagatttcta accggttctc t 21

10

<210> 162
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

20

<400> 162

Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 163
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30

<400> 163
 atgcaagcta cacaatttc aacc 24

35

<210> 164
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 164

Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

45

<210> 165
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

55

<400> 165
 gactactaca tgagc 15

60

<210> 166
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5 <400> 166

Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

10 <210> 167
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 167
tacattacta gtagtgtag taccatatac tactcagcct ctgtgaaggg c 51

20 <210> 168
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 168

Tyr Ile Thr Ser Ser Gly Ser Thr Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 169
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40 <400> 169
gatttcagtg gctggtcgg agtccacttt gactac 36

45 <210> 170
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 170

Asp Phe Ser Gly Trp Phe Gly Val His Phe Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 171
<211> 48

ES 2 788 457 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 171
 aagtctagtc agagcctcct gcatagtgat ggaagacct attgtat 48

10
 <210> 172
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 172

 Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15

20
 <210> 173
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30
 <400> 173
 gaagttcca accggtctc t 21

35
 <210> 174
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 174

 Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

45
 <210> 175
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 175
 atgcaaagta tacaacttac gtggacg 27

55
 <210> 176
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 176

Met Gln Ser Ile Gln Leu Thr Trp Thr
1 5

5

<210> 177
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15

<400> 177
agctatgccatgagc 15

20

<210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 178

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

30

<210> 179
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 179
gatattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtaaggg c 51

40

<210> 180
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 180

Asp Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

50

Gly

<210> 181
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

55

ES 2 788 457 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 181
 cggcgggtggc aggggtactt cgatctc 27

10 <210> 182
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 182

Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu
 1 5

20 <210> 183
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 183
 agggccaggc agcgtgttga cagcaggtac ttagcc 36

30 <210> 184
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 184

Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg Tyr Leu Ala
 1 5 10

40 <210> 185
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 185
 ggtgcatcca gcaggccac t 21

55 <210> 186
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <400> 186

ES 2 788 457 T3

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

5 <210> 187
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 187
 cagcagtatg gtagctcacc gctcact 27

15 <210> 188
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 188

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

25 <210> 189
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 189
 cgctatgccca tgaac 15

40 <210> 190
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 190

Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

50 <210> 191
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 191
 ggtattatg gtagtggtgg taggacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

ES 2 788 457 T3

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
 1 5 10

5 <210> 197
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 197
 ggtgcatcca ccaggccac t 21

15 <210> 198
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 198

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
 1 5

25 <210> 199
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 199
 caccagtata gtaactggat gtgcagt 27

40 <210> 200
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45 <400> 200

His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys Ser

1 5

50 <210> 201
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 201

ES 2 788 457 T3

agttactact ggagc 15

<210> 202
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 202

Ser Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

15

<210> 203
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 203
 cgtattata tcagtgagg gaccacctc aaccctccc tcaagagt 48

25

<210> 204
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 204

35

Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

40

<210> 205
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45

<400> 205
 gatagatatt atggctacct tgactac 27

50

<210> 206
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 206

Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr
 1 5

ES 2 788 457 T3

5 <210> 207
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 207
 agggccagtc agagtgttag ccgcagttac ttagcc 36

15 <210> 208
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 208

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

25 <210> 209
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 209
 gatgcatcca gcaggccac t 21

40 <210> 210
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 210

Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

50 <210> 211
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 211
 cagcagtatg gtagttcacc gagcacc 27

60 <210> 212
 <211> 9
 <212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 212

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

10

<210> 213
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 213
cattactact ggagc 15

20

<210> 214
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 214

30

His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

35

<210> 215
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40

<400> 215
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacctctccc tcaagagt 48

45

<210> 216
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50

<400> 216

Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

55

<210> 217
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 217
 ggtatgggct ttgactac 18

<210> 218
 <211> 6
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 218

Gly Met Gly Phe Asp Tyr
1 5

20 <210> 219
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 219
 cgggcaagtc aggcattag aatgattta ggc 33

<210> 220
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 220

Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

45 <210> 221
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 221
 tctgcatcca gttgcaaag t 21

<210> 222
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 222

Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

5 <210> 223
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 223
ctacagcata atagttccc tccgacg 27

15 <210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 224

Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

30 <210> 225
<211> 30
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 225

Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr
1 5 10 15

35 Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
20 25 30

40 <210> 226
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 226

Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro
1 5 10 15

45 Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
20 25

<210> 227
<211> 3222
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

ES 2 788 457 T3

<400> 227

atgaagacgt	tgctgttgga	cttggettgt	tggtcactgc	tcttccagcc	cggttggtg	60
tccttttagtt	cccaggtgag	tcagaactgc	cacaatggca	gctatgaaat	cagcgtcctg	120
atgatgggca	actcagcctt	tgcaagagccc	ctgaaaaact	tggaagatgc	ggtgaatgag	180
gggctggaaa	tagtgagagg	acgtctgcaa	aatgctggcc	taaatgtgac	tgtgaacgct	240
actttcatgt	attcggatgg	tctgattcat	aactcagggc	actgccggag	tagcacctgt	300
gaaggcctcg	acctactcag	gaaaatttca	aatgcacaac	ggatgggctg	tgtcctcata	360
gggccctcat	gtacatactc	caccttccag	atgtaccttg	acacagaatt	gagctacccc	420
atgatctcag	ctggaagttt	tggattgtca	tgtgactata	aagaaacctt	aaccaggctg	480
atgtctccag	ctagaaagtt	gatgtacttc	ttggttaact	tttgaaaac	caacgatctg	540
cccttcaaaa	cttattcctg	gagcacttcg	tatgtttaca	agaatggtac	agaaactgag	600
gactgtttct	ggtaccttaa	tgctctggag	gctagcgttt	cctatttctc	ccacgaactc	660
ggctttaagg	tggtgttaag	acaagataag	gagtttcagg	atatcttaat	ggaccacaac	720
aggaaaagca	atgtgattat	tatgtgtggt	ggtccagagt	tcctctacaa	gctgaagggg	780
gaccgagcag	tggctgaaga	cattgtcatt	attctagtgg	atcttttcaa	tgaccagtac	840
tttgaggaca	atgtcacagc	ccctgactat	atgaaaaatg	tccttgttct	gacgctgtct	900

ES 2 788 457 T3

cctgggaatt cccttctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac 960
 tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt 1020
 gaaaatggag aaaatattac ccccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt 1080
 gaagggatg acgggccagt gaccttggat gactgggggg atggtgacag taccatggtg 1140
 cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgatacccac 1200
 gtaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca ctggaagaa ctctaaactt 1260
 cctaatagata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccotcact 1320
 ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgtc ctctctgatgc tcagaaaata tagaaaagat 1380
 tatgaacttc gtcagaaaaa atggtcccac attcctcctg aaaatatctt tcctctggag 1440
 accaatgaga ccaatcatgt tagcctcaag atcgatgatg acaaaagacg agatacaatc 1500
 cagagactac gacagtgcaa atacgacaaa aagcgagtga ttctcaaaga tctcaagcac 1560
 aatgatggta atttactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac 1620
 tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat cttcggggtg 1680
 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttctaccct 1740
 gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga 1800
 atgtcatatc tgactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc 1860
 gtagtggaca gtagaatggg ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct 1920
 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa 1980
 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc 2040
 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga 2100
 atgaaacctt tccgccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg 2160
 tacctacttg taaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttcaaaaaa 2220
 attgagacta cacttgccaa gatatttggg ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat 2280
 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag 2340
 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatggtg 2400
 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat 2460
 gaggaagtta caatctactt cagtgcatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc 2520
 acccccatgg aagtggtgga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattggt 2580
 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggatgat cgtacatggt ggctagtggt 2640
 ttgctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc 2700
 ctcagettca tggggacctt tgagctggag catcttcctg gcctccaat atggattcgc 2760
 attggagttc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat 2820

ES 2 788 457 T3

tgtctatattg gagatacggg caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg 2880
agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt 2940
tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg 3000
actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaaccctc ctactgtgga gaatcaacag 3060
cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccactctt tacagaaaag acaggcagca 3120
gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac 3180
ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctatTTTT aa 3222

5 <210> 228
<211> 1073
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 228

ES 2 788 457 T3

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
85 90 95

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
165 170 175

ES 2 788 457 T3

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
 180 185 190
 Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
 195 200 205
 Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
 210 215 220
 Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240
 Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255
 Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270
 Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285
 Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300
 Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320
 Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
 325 330 335
 Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350
 His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
 355 360 365
 Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
 370 375 380
 Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
 385 390 395 400
 Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
 405 410 415
 Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp Ile Thr Gly Arg Gly Pro Gln Ile Leu
 420 425 430
 Met Ile Ala Val Phe Thr Leu Thr Gly Ala Val Val Leu Leu Leu Leu

ES 2 788 457 T3

	435		440		445														
Val	Ala	Leu	Leu	Met	Leu	Arg	Lys	Tyr	Arg	Lys	Asp	Tyr	Glu	Leu	Arg				
	450					455					460								
Gln	Lys	Lys	Trp	Ser	His	Ile	Pro	Pro	Glu	Asn	Ile	Phe	Pro	Leu	Glu				
465					470					475					480				
Thr	Asn	Glu	Thr	Asn	His	Val	Ser	Leu	Lys	Ile	Asp	Asp	Asp	Lys	Arg				
				485					490					495					
Arg	Asp	Thr	Ile	Gln	Arg	Leu	Arg	Gln	Cys	Lys	Tyr	Asp	Lys	Lys	Arg				
			500					505					510						
Val	Ile	Leu	Lys	Asp	Leu	Lys	His	Asn	Asp	Gly	Asn	Phe	Thr	Glu	Lys				
		515					520					525							
Gln	Lys	Ile	Glu	Leu	Asn	Lys	Leu	Leu	Gln	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Asn	Leu				
	530					535					540								
Thr	Lys	Phe	Tyr	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Asp	Thr	Met	Ile	Phe	Gly	Val				
545					550					555									
Ile	Glu	Tyr	Cys	Glu	Arg	Gly	Ser	Leu	Arg	Glu	Val	Leu	Asn	Asp	Thr				
				565					570					575					
Ile	Ser	Tyr	Pro	Asp	Gly	Thr	Phe	Met	Asp	Trp	Glu	Phe	Lys	Ile	Ser				
			580					585					590						
Val	Leu	Tyr	Asp	Ile	Ala	Lys	Gly	Met	Ser	Tyr	Leu	His	Ser	Ser	Lys				
		595					600					605							
Thr	Glu	Val	His	Gly	Arg	Leu	Lys	Ser	Thr	Asn	Cys	Val	Val	Asp	Ser				
	610					615					620								
Arg	Met	Val	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Phe	Gly	Cys	Asn	Ser	Ile	Leu	Pro				
625					630					635					640				
Pro	Lys	Lys	Asp	Leu	Trp	Thr	Ala	Pro	Glu	His	Leu	Arg	Gln	Ala	Asn				
				645					650					655					
Ile	Ser	Gln	Lys	Gly	Asp	Val	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Ile	Ile	Ala	Gln	Glu				
			660					665					670						
Ile	Ile	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Phe	Tyr	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Asp	Arg				
		675					680					685							
Asn	Glu	Lys	Ile	Phe	Arg	Val	Glu	Asn	Ser	Asn	Gly	Met	Lys	Pro	Phe				
	690					695					700								

ES 2 788 457 T3

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

ES 2 788 457 T3

Arg Ile His Val Ser Gly Ser Thr Ile Ala Ile Leu Lys Arg Thr Glu
 965 970 975

Cys Gln Phe Leu Tyr Glu Val Arg Gly Glu Thr Tyr Leu Lys Gly Arg
 980 985 990

Gly Asn Glu Thr Thr Tyr Trp Leu Thr Gly Met Lys Asp Gln Lys Phe
 995 1000 1005

Asn Leu Pro Thr Pro Pro Thr Val Glu Asn Gln Gln Arg Leu Gln
 1010 1015 1020

Ala Glu Phe Ser Asp Met Ile Ala Asn Ser Leu Gln Lys Arg Gln
 1025 1030 1035

Ala Ala Gly Ile Arg Ser Gln Lys Pro Arg Arg Val Ala Ser Tyr
 1040 1045 1050

Lys Lys Gly Thr Leu Glu Tyr Leu Gln Leu Asn Thr Thr Asp Lys
 1055 1060 1065

Glu Ser Thr Tyr Phe
 1070

5 <210> 229
 <211> 420
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 229

ES 2 788 457 T3

Met Lys Thr Leu Leu Leu Asp Leu Ala Leu Trp Ser Leu Leu Phe Gln
 1 5 10 15

Pro Gly Trp Leu Ser Phe Ser Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn
 20 25 30

Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala
 35 40 45

Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile
 50 55 60

Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala
 65 70 75 80

Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg
 85 90 95

ES 2 788 457 T3

Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala
 100 105 110

Gln Arg Met Gly Cys Val Leu Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr
 115 120 125

Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala
 130 135 140

Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu
 145 150 155 160

Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys
 165 170 175

Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val
 180 185 190

Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala
 195 200 205

Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val
 210 215 220

Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn
 225 230 235 240

Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr
 245 250 255

Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu
 260 265 270

Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln Tyr Phe Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro
 275 280 285

Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser
 290 295 300

Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp
 305 310 315 320

Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu
 325 330 335

Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala
 340 345 350

ES 2 788 457 T3

His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr
355 360 365

Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr
370 375 380

Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His
385 390 395 400

Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys
405 410 415

Asn Ser Lys Leu
420

- 5 <210> 230
- <211> 1444
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- 10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

- <400> 230

ES 2 788 457 T3

gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt	60
gtccactccc aggtgcagct acagcagtg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc	120
ctgtccctca cctgcgctgt ctttgggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc	180
cgccagcccc caggggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc	240
aacgacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag	300
ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga	360
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaaccct ggtcaccgtc	420
agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctctc caagagcacc	480
tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg	540
gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag	600
tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc	660
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga caagaaagtt	720
gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg	780
gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaag acaccctcat gatctcccgg	840
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	900
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaa caaagccgcg ggaggagcag	960
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1020
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc	1080
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg	1140
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggtt ctatcccagc	1200
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgcct	1260
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1320
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1380
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataat agggataaca gggtaatact	1440
agag	1444

<210> 231
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 231

5

10

ES 2 788 457 T3

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys
 20 25 30

Pro Ser Glu Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Phe Gly Gly Ser Phe
 35 40 45

Ser Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln
 85 90 95

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His Trp
 115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
 130 135 140

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

ES 2 788 457 T3

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

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

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
 195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
 210 215 220

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

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 260 265 270

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

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

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 305 310 315 320

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

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 340 345 350

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

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

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415

ES 2 788 457 T3

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

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460

Ser Pro Gly Lys
 465

5 <210> 232
 <211> 722
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 232

gcgggcgcct caccatggga tggagctgta tcatcctctt cttggtagca acagctacag 60
 gtgtccactc cgaatatgtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg 120
 aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctggtatc 180
 agcagaaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcattcacc agggccactg 240
 gaatcccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcggca 300
 gcctgcagtc tgaagatddd gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga 360
 cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca 420
 tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctggtgtg tgccctgctga 480
 ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggagggt ggataacgcc ctccaatcgg 540
 gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca 600
 gcaccctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca 660
 cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacia agagcttcaa caggggagag tgtagtcta 720
 ga 722

15 <210> 233
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 233

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 234

 ataagaatgc ggccgcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac 60
 agctacaggt gtccactccg aatagtgat gacgcagtct ccagccacc tg 112

10
 <210> 235
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

20
 <400> 235
 gccaccgtac gttgattc cacgtggtc cctggccga acgtc 45

25
 <210> 236
 <211> 103
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 236

 ccggaattcc tcaccatggg atggagctgt atcctctct tcttggtagc aacagctaca 60
 ggtgtccact cccaggtgca gctacagcag tggggcgcag gac 103

35
 <210> 237
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 237
 ggagctgag ctgacggtga ccaggttcc ctggccccag tggtc 45

45
 <210> 238
 <211> 352
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 238

ES 2 788 457 T3

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cactactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
 actgggtact ttgactactg gggccagga accctggtca ccgtctcctc ag 352

5 <210> 239
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 239

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

15 <210> 240
 <211> 322
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 240

```

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa      120
cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccgc tggcatccca      180
gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag      240
cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctccctcac tttcggcgga      300
gggaccaagg tggagatcaa ac                                             322
    
```

5 <210> 241
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 241

```

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
                20           25           30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
                35           40           45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
                50           55           60

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

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

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
                100           105
    
```

15 <210> 242
 <211> 353
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

25 <400> 242

ES 2 788 457 T3

caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattaactact ggagctggat ccggcagccc 120
 gccgggaagg gactggaatg gattgggcgt atctatatca gtgggaggac cagctacaac 180
 ccctccctca agagtcgagt caccgtgtca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag agatcggcta 300
 actgggtact ttgactactg gggccagggg accctgggtca ccgtctcctc agc 353

5 <210> 243
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 243

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

15 <210> 244
 <211> 329
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 244

ES 2 788 457 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtacatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagact ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcacccat gtgcagtttt 300

 ggccagggga ccaagctgga gatcaaacg 329

5 <210> 245
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 245

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

 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30

 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

 Ile Tyr Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

 Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro
 85 90 95

 Met Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

15 <210> 246
 <211> 362
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 246

25

ES 2 788 457 T3

gaggtgcagc tgttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt caccttttagc cgctatgccca tgaactgggt cgcaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180
 gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300
 gatttttggga gtggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360
 gc 362

5 <210> 247
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético
 <400> 247

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

15 <210> 248
 <211> 323
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 248

```

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgta gggccagtca gagggttagt agaagcttag cctggtagca gcagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctacggt gcatccacca gggccactgg gatcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct      240
gaagatggtg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggatgtgcag ttttggccag      300
gggaccaagc tggagatcaa acg                                             323
    
```

5

<210> 249

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 249

15

```

Glu Ile Val Met Thr Pro Ser Ser Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1           5           10           15
    
```

```

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
          20           25           30
    
```

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
          35           40           45
    
```

```

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
    
```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65           70           75           80
    
```

```

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys
          85           90           95
    
```

```

Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
    
```

<210> 250

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25

<400> 250

ES 2 788 457 T3

cattactact ggagc 15

<210> 251
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

10

<400> 251

His Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

15

<210> 252
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 252
 cgatatcata tcagtgaggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt 48

25

<210> 253
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 253

35

Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
 1 5 10 15

40

<210> 254
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

45

<400> 254
 gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

50

<210> 255
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

55

<400> 255

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
 1 5

ES 2 788 457 T3

5 <210> 256
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

10 <400> 256
 agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

15 <210> 257
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 257

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

25 <210> 258
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

35 <400> 258
 ggtgcatcca gcagggccgc t 21

40 <210> 259
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 259

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala
 1 5

50 <210> 260
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 260
 cagcagtatg gtagctccct cact 24

60 <210> 261
 <211> 8
 <212> PRT

ES 2 788 457 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

5

<400> 261

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

10

<210> 262
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 262
cattactact ggagc 15

20

<210> 263
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 263

30

His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

35

<210> 264
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40

<400> 264
cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aaccctccc tcaagagt 48

45

<210> 265
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

50

<400> 265

Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

55

<210> 266
<211> 27
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5

<400> 266
gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 267
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15

<400> 267

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

20

<210> 268
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 268
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

30

<210> 269
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40

<400> 269

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

45

<210> 270
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50

<400> 270
ggtacatcca gcaggccac t 21

55

<210> 271
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 271

Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

5

<210> 272
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

15

<400> 272
 cagcagtatg gtagctcacc catgtgcagt 30

20

<210> 273
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25

<400> 273

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser
1 5 10

30

<210> 274
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

40

<400> 274
 cgctatgcca tgaac 15

40

<210> 275
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

45

<400> 275

Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

50

<210> 276
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 276
 ggtattagtg gtagtggtg tagcacatac tacgcagact ccgtaaggg c 51

5 <210> 277
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 277

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

15 **Gly**

<210> 278
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 278
 gatcgcgatt ttggagtg tccattgac tac 33

<210> 279
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <400> 279

Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

40 <210> 280
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 280
 agggccagtc agagtgttag tagaagctta gcc 33

50 <210> 281
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

ES 2 788 457 T3

<400> 281

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Leu Ala
1 5 10

5 <210> 282
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 282
 ggtgcatcca ccaggccac t 21

15 <210> 283
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

25 <400> 283

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

30 <210> 284
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 284
 cagcagtata ataactggat gtgcagt 27

40 <210> 285
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 285

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys Ser
1 5

50 <210> 286
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 286

ES 2 788 457 T3

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt gggtactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccttg 240
 aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgagag agaacgtgga 300
 tacacctatg gtaactttga ccaactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctcctca 357

5 <210> 287
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 287

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

15 <210> 288
 <211> 315
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 288

ES 2 788 457 T3

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagc agcaggtact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcacccca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgta tttctgtcag cagtatgaaa ggtcattcac tttcggccct 300
 gggaccaaag tggat 315

5 <210> 289
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 289

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Thr Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe
 85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp
 100 105

15 <210> 290
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

25 <400> 290
 ggttactact ggagc 15

<210> 291
 <211> 5

ES 2 788 457 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 291

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

10 <210> 292
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 292
 gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aaccggtccc tcaag 45

25 <210> 293
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 293

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

35 <210> 294
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 294
 gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

45 <210> 295
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 295

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
 1 5 10

55 <210> 296
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <210> 296
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

5 <400> 296
 agggccagtc agagtgttag cagcaggtac ttagcct 37

<210> 297
 <211> 12
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <400> 297

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

20 <210> 298
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 298
 ggtgcatcca gcaggccac tg 22

<210> 299
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

40 <400> 299

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

45 <210> 300
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

50 <400> 300
 cagcagtatg aaagtcatt cactt 25

<210> 301
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

60

ES 2 788 457 T3

<400> 301

Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Thr
1 5

5 <210> 302
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

15 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(3)
<223> Cualquier aminoácido

20 <220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Met o Trp

25 <220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser o Asn

<400> 302

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5

30

35 <210> 303
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

45 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido

50 <220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido o no presente

55 <220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Cualquier aminoácido

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(9)
 <223> Thr o Ile

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Tyr, Thr o Ser

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(12)
 <223> Cualquier aminoácido

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 <223> Leu o Val

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Ser o Gly

<400> 303

Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa
1 5 10 15

30 <210> 304
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido y esta región puede abarcar de 4 a 6 restos

45 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(10)
 <223> Cualquier aminoácido y esta región puede abarcar de 2 a 3 restos

50 <400> 304

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

55 <210> 305
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
 <221> MOD_RES

ES 2 788 457 T3

5 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Gln, His o Met

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Tyr o Ser

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(10)
 <223> Cualquier aminoácido en esta región puede abarcar de 5 a 7 restos

<400> 307

Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10

20 <210> 308
 <211> 702
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 308

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt cactccgaa	60
atagtgatga cgcagtetcc agccaccctg tctgtgtctc caggggaaag agccaccctc	120
tcctgcaggg ccagtcagag tgtagcaga aacttagcct ggtatcagca gaaacctggc	180
caggctccca ggctcctcat ctatgggtgca tccaccaggg ccaactggaat cccagccagg	240
ttcagtggca gtgggtctgg gacagagttc actctcacca tcggcagcct gcagtctgaa	300
gattttgcag tttattactg tcagcagtat aaaacctggc ctgggacgtt cggccaaggg	360
accaacgtgg aatcaaacg tacgggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct	420
gatgagcagt tgaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc tgctgaataa cttctatccc	480
agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag	540
agtgtcacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgaccctg	600
agcaaagcag actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg	660
agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt ag	702

35 <210> 309
 <211> 1407
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

40 <400> 309

ES 2 788 457 T3

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt cactcccag	60
gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc	120
tgcgctgtct ttggtgggtc tttcagtggg tactactgga gctggatccg ccagcccca	180
gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatcgtg gaaacaccaa cgacaaccg	240
tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt cgcctgaag	300
ctgagttctg tgaccgccgc ggacacggct gtttattact gtgcgagaga acgtggatac	360
acctatggta actttgacca ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtcag ctcagcctcc	420
accaagggcc catcggctct cccctggca ccctectcca agagcacctc tgggggcaca	480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac	540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tectacagtc ctcaggactc	600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgcc tccagcagct tgggcacca gacctacatc	660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagtga gcccaaact	720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca	780
gtcttctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc	840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg	900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg	960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac	1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc	1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc	1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg	1200
gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac	1260
tccgacggct ccttcttct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag	1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag	1380
agcctctccc tgtctccggg taaataa	1407

5 <210> 310
 <211> 1410
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético
 <400> 310

ES 2 788 457 T3

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctatth taaaagggtg ccagtgtag 60
 gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttagccgc tatgccatga actgggtccg ccaggtcca 180
 gggaaagggc tggagtgggt ctcaaggatt agtgggagtg gtggtaggac atactacgca 240
 gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac actatatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcaa agatcgcgat 360
 ttttgagtg gtccatttga ctactggggc cagggaacc tggtcaccgt cagctcagcc 420
 tccaccaagg gcccatcgggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcaca gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgccaccg tgccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaa acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

 tacaagtgca aggtctcaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgctg gtcaaaggtt tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
 gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag cagggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaataa 1410

<210> 311
 <211> 705
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

10

<400> 311

ES 2 788 457 T3

atgaggctcc ctgctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
 gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc 120
 ctctcctgca gggccagtca gagggttagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct 180
 gggcaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300
 gaagatdddg cagdddatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ddddggccag 360
 gggaccaagc tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtdgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtac ccatcagggc 660
 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

5 <210> 312
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Leu o Val

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Ser o Gly

<400> 312

Ser Xaa Lys Xaa
1

25 <210> 313
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Lys o Arg

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)

ES 2 788 457 T3

<223> Ala o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Val o Leu

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Ser o Leu

10

<400> 313

Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa
 1 5

15

<210> 314
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 314

25

Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr
 1 5 10

30

<210> 315
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

35

<400> 315

Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp
 1 5 10 15

40

<210> 316
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> *Escherichia coli*

45

<400> 316

Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly
 1 5 10 15

Cys Tyr

50

<210> 317
 <211> 638
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 317

Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val
 1 5 10 15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu
 20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn
 35 40 45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly
 50 55 60

Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu
 65 70 75 80

Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu
 85 90 95

Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr
 100 105 110

Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
 115 120 125

ES 2 788 457 T3

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
 130 135 140

Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys
 145 150 155 160

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
 165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
 180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
 195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
 210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala
 225 230 235 240

Val Ala Glu Asp Ile Val Ile Ile Leu Val Asp Leu Phe Asn Asp Gln
 245 250 255

Tyr Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu
 260 265 270

Val Leu Thr Leu Ser Pro Gly Asn Ser Leu Leu Asn Ser Ser Phe Ser
 275 280 285

Arg Asn Leu Ser Pro Thr Lys Arg Asp Phe Ala Leu Ala Tyr Leu Asn
 290 295 300

Gly Ile Leu Leu Phe Gly His Met Leu Lys Ile Phe Leu Glu Asn Gly
 305 310 315 320

Glu Asn Ile Thr Thr Pro Lys Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr
 325 330 335

Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
 340 345 350

Asp Ser Thr Met Val Leu Leu Tyr Thr Ser Val Asp Thr Lys Lys Tyr
 355 360 365

Lys Val Leu Leu Thr Tyr Asp Thr His Val Asn Lys Thr Tyr Pro Val
 370 375 380

Asp Met Ser Pro Thr Phe Thr Trp Lys Asn Ser Lys Leu Pro Asn Asp

<210> 318
<211> 707
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

10 <400> 318

ES 2 788 457 T3

Ser Gln Val Ser Gln Asn Cys His Asn Gly Ser Tyr Glu Ile Ser Val
1 5 10 15

Leu Met Met Gly Asn Ser Ala Phe Ala Glu Pro Leu Lys Asn Leu Glu
20 25 30

Asp Ala Val Asn Glu Gly Leu Glu Ile Val Arg Gly Arg Leu Gln Asn
35 40 45

Ala Gly Leu Asn Val Thr Val Asn Ala Thr Phe Met Tyr Ser Asp Gly
50 55 60

Leu Ile His Asn Ser Gly Asp Cys Arg Ser Ser Thr Cys Glu Gly Leu
65 70 75 80

Asp Leu Leu Arg Lys Ile Ser Asn Ala Gln Arg Met Gly Cys Val Leu
85 90 95

Ile Gly Pro Ser Cys Thr Tyr Ser Thr Phe Gln Met Tyr Leu Asp Thr
100 105 110

Glu Leu Ser Tyr Pro Met Ile Ser Ala Gly Ser Phe Gly Leu Ser Cys
115 120 125

Asp Tyr Lys Glu Thr Leu Thr Arg Leu Met Ser Pro Ala Arg Lys Leu
130 135 140

Met Tyr Phe Leu Val Asn Phe Trp Lys Thr Asn Asp Leu Pro Phe Lys
145 150 155 160

Thr Tyr Ser Trp Ser Thr Ser Tyr Val Tyr Lys Asn Gly Thr Glu Thr
165 170 175

Glu Asp Cys Phe Trp Tyr Leu Asn Ala Leu Glu Ala Ser Val Ser Tyr
180 185 190

Phe Ser His Glu Leu Gly Phe Lys Val Val Leu Arg Gln Asp Lys Glu
195 200 205

Phe Gln Asp Ile Leu Met Asp His Asn Arg Lys Ser Asn Val Ile Ile
210 215 220

Met Cys Gly Gly Pro Glu Phe Leu Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Arg Ala

ES 2 788 457 T3

225					230						235				240
Val	Ala	Glu	Asp	Ile	Val	Ile	Ile	Leu	Val	Asp	Leu	Phe	Asn	Asp	Gln
				245					250					255	
Tyr	Leu	Glu	Asp	Asn	Val	Thr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Met	Lys	Asn	Val	Leu
			260					265					270		
Val	Leu	Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Leu	Asn	Ser	Ser	Phe	Ser
		275					280					285			
Arg	Asn	Leu	Ser	Pro	Thr	Lys	Arg	Asp	Phe	Ala	Leu	Ala	Tyr	Leu	Asn
	290					295					300				
Gly	Ile	Leu	Leu	Phe	Gly	His	Met	Leu	Lys	Ile	Phe	Leu	Glu	Asn	Gly
305					310					315					320
Glu	Asn	Ile	Thr	Thr	Pro	Lys	Phe	Ala	His	Ala	Phe	Arg	Asn	Leu	Thr
				325					330					335	
Phe	Glu	Gly	Tyr	Asp	Gly	Pro	Val	Thr	Leu	Asp	Asp	Trp	Gly	Asp	Val
			340					345					350		
Asp	Ser	Thr	Met	Val	Leu	Leu	Tyr	Thr	Ser	Val	Asp	Thr	Lys	Lys	Tyr
		355					360					365			
Lys	Val	Leu	Leu	Thr	Tyr	Asp	Thr	His	Val	Asn	Lys	Thr	Tyr	Pro	Val
	370					375					380				
Asp	Met	Ser	Pro	Thr	Phe	Thr	Trp	Lys	Asn	Ser	Lys	Leu	Pro	Asn	Asp
385					390					395					400
Ile	Thr	Gly	Arg	Gly	Pro	Gln	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr
				405					410					415	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Ala	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe
			420					425					430		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
		435					440					445			
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
	450					455					460				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
465					470					475					480
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
				485					490					495	

ES 2 788 457 T3

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 500 505 510

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 515 520 525

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 530 535 540

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 545 550 555 560

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 565 570 575

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 580 585 590

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 595 600 605

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 610 615 620

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Leu Asp Leu
 625 630 635 640

Asp Asp Val Cys Ala Glu Ala Gln Asp Gly Glu Leu Asp Gly Leu Trp
 645 650 655

Thr Thr Ile Thr Ile Phe Ile Ser Leu Phe Leu Leu Ser Val Cys Tyr
 660 665 670

Ser Ala Ser Val Thr Leu Phe Lys Val Lys Trp Ile Phe Ser Ser Val
 675 680 685

Val Glu Leu Lys Gln Thr Ile Ser Pro Asp Tyr Arg Asn Met Ile Gly
 690 695 700

Gln Gly Ala
 705

<210> 319
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 788 457 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 319

Gly Phe Leu Gly
1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de anticuerpo anti-GCC que comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
2. La molécula anti-GCC de la reivindicación 1, en donde la molécula de anticuerpo es un anticuerpo IgG1.
- 10 3. El anticuerpo anti-GCC de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la molécula de anticuerpo es una molécula de anticuerpo biespecífica, que comprende:
- 15 (a) dos moléculas de anticuerpo que se conjugan juntas, una con especificidad de unión por GCC y otra con especificidad de unión para un segundo antígeno;
- (b) una sola molécula de anticuerpo que comprende una cadena con especificidad de unión por GCC y una segunda cadena con especificidad de unión por un segundo antígeno; o
- (c) una molécula de anticuerpo monocatenario que tiene especificidad de unión por GCC y por un segundo antígeno.
- 20 4. La molécula de anticuerpo anti-GCC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que además comprende una región Fc, en donde la región Fc es una región Fc de tipo silvestre o está mutada para modificar la función efectora.
5. La molécula de anticuerpo anti-GCC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la molécula de anticuerpo se conjuga a un agente terapéutico o a un marcador detectable.
- 25 6. La molécula anti-GCC de la reivindicación 5, en donde el marcador detectable es un radiomarcador seleccionado opcionalmente entre ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{90}Y , ^{177}Lu y un radionúclido emisor de positrones.
7. Un inmunoconjugado de fórmula (I):
- 30
$$\text{Ab}-(\text{x-z})_m \quad (I)$$
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
- 35 Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4;
 X es un resto enlazador que conecta Ab y Z;
 Z es un agente terapéutico o un marcador; y
 m es el número de restos -X-Z por cada molécula de anticuerpo anti-GCC en el inmunoconjugado de fórmula (I) y m es un número entero de 1 a 15.
- 40 8. El inmunoconjugado de la reivindicación 7, en donde Z es un marcador detectable o un agente terapéutico seleccionado opcionalmente entre un maitansinoide o maitansina, una dolastatina y una auristatina; y/o en donde el enlazador -X- tiene la fórmula $-\text{A}_a-\text{W}_w-\text{Y}_y-$ y el inmunoconjugado se caracteriza por la fórmula (II):
- 45
$$\text{Ab}-(\text{A}_a-\text{W}_w-\text{Y}_y-\text{Z})_m \quad (II)$$
- o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en donde:
- 50 -A- es una Unidad ensanchadora;
 a es 0 o 1;
 cada -W- es independientemente una unidad de aminoácido;
 w es un número entero de 0 a 12;
 -Y- es una unidad espaciadora autoinmolable;
 y es 0, 1 o 2;
- 55 Z es un agente terapéutico o un marcador; y
 m es un número entero de 1 a 15.
9. El inmunoconjugado de la reivindicación 8, en donde el marcador detectable es un radiomarcador seleccionado opcionalmente entre ^{213}Bi , ^{225}Ac , ^{90}Y , ^{177}Lu y un radionúclido emisor de positrones.
- 60 10. Una composición farmacéutica que comprende la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 65 11. Una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, para su uso en un método para tratar a un sujeto para un trastorno.

12. Uso de una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, un inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o la composición farmacéutica de la reivindicación 10, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno.
- 5 13. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado o la composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el uso de la reivindicación 12, en donde el trastorno es un cáncer o una lesión metastásica del mismo.
- 10 14. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 13, en donde el cáncer es adenocarcinoma de pulmón, cáncer pancreático o un cáncer del sistema gastrointestinal, en donde el cáncer del sistema gastrointestinal se selecciona opcionalmente entre cáncer colorrectal, cáncer gástrico y cáncer de esófago.
- 15 15. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado o la composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la reivindicación 11 o el uso de la reivindicación 12, en donde la molécula de anticuerpo o el inmunoconjugado se administra en combinación con uno o más agentes terapéuticos adicionales.
- 20 16. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 15, en donde los uno o más agentes terapéuticos adicionales comprenden un agente quimioterapéutico seleccionado entre un agente que daña el ADN y un agente que interrumpe la replicación celular.
- 25 17. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 16, en donde:
- 30 (a) el agente que daña el ADN es un inhibidor de topoisomerasa I seleccionado opcionalmente entre irinotecán, topotecán, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos y doxorubicina; un inhibidor de topoisomerasa II seleccionado opcionalmente entre etopósido, tenipósido y daunorrubicina; un agente alquilante opcionalmente seleccionado entre melfalano, clorambucilo, busulfán, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, dacarbazina, metotrexato, mitomicina C y ciclofosfamida; un intercalador de ADN opcionalmente seleccionado entre cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; un generador de radicales libres; o un mimético de nucleósido opcionalmente seleccionado entre 5-fluorouracilo, capecitabina, gemcitabina, fludarabina, citarabina, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina e hidroxiurea; o
- 35 (b) el agente que interrumpe la replicación celular se selecciona entre paclitaxel, docetaxel, un análogo relacionado del paclitaxel o docetaxel, vincristina, vinblastina, un análogo relacionado de la vincristina o vinblastina, talidomida, lenalidomida, un análogo relacionado de la talidomida o lenalidomida, un inhibidor de proteína tirosina cinasa, un inhibidor del proteasoma, un inhibidor de NF- κ B e I κ B cinasa, un anticuerpo que se une a proteínas sobreexpresadas en cánceres y que por tanto regula negativamente la replicación celular y un inhibidor de proteínas o enzimas que se sabe que están reguladas positivamente, sobreexpresadas o activadas en los cánceres, cuya inhibición regula negativamente la replicación celular.
- 40 18. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 17, en donde el generador de radicales libres es bleomicina; el análogo relacionado de la talidomida o lenalidomida es CC-5013 o CC-4047; el inhibidor de proteína tirosina cinasa es mesilato de imatinib o gefitinib; el inhibidor del proteasoma es bortezomib; o el anticuerpo que se une a proteínas sobreexpresadas en cánceres y que por tanto regula negativamente la replicación celular se selecciona entre trastuzumab, rituximab, cetuximab y bevacizumab.
- 45 19. La molécula de anticuerpo, el inmunoconjugado, la composición farmacéutica o el uso de la reivindicación 15, en donde el trastorno es cáncer colorrectal y los uno o más agentes terapéuticos adicionales son 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, leucovorina, irinotecán, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, platino o una combinación de los mismos opcionalmente seleccionado entre oxaliplatino/capecitabina (XELOX), 5-FU/leucovorina/oxaliplatino (FOLFOX), 5-FU/leucovorina/irinotecán (FOLFIRI), FOL-FOX más bevacizumab y FOLFIRI más bevacizumab.
- 50 20. Secuencias de ácido nucleico aisladas que codifican una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
- 55 21. Las secuencias de ácido nucleico aisladas de la reivindicación 20, que comprenden las secuencias de ácido nucleico de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19.
- 60 22. Una célula que comprende las secuencias de ácido nucleico aisladas de la reivindicación 20 o la reivindicación 21.
- 65 23. Un método para producir una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende cultivar la célula de la reivindicación 22 en condiciones que permiten la producción de una molécula de anticuerpo, produciendo de este modo la molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
24. Un vector que comprende las secuencias de ácido nucleico aisladas de la reivindicación 20 o la reivindicación 21.

25. Un kit que comprende una molécula de anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o un inmunoconjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

EFICACIA DE 5F9-vcMMAF, 5F9-DM1, 5F9-DM4 EN RATONES SCID PORTADORES DE 293-GCC USANDO LA PAUTA q14d (CPGC-06-EF04)

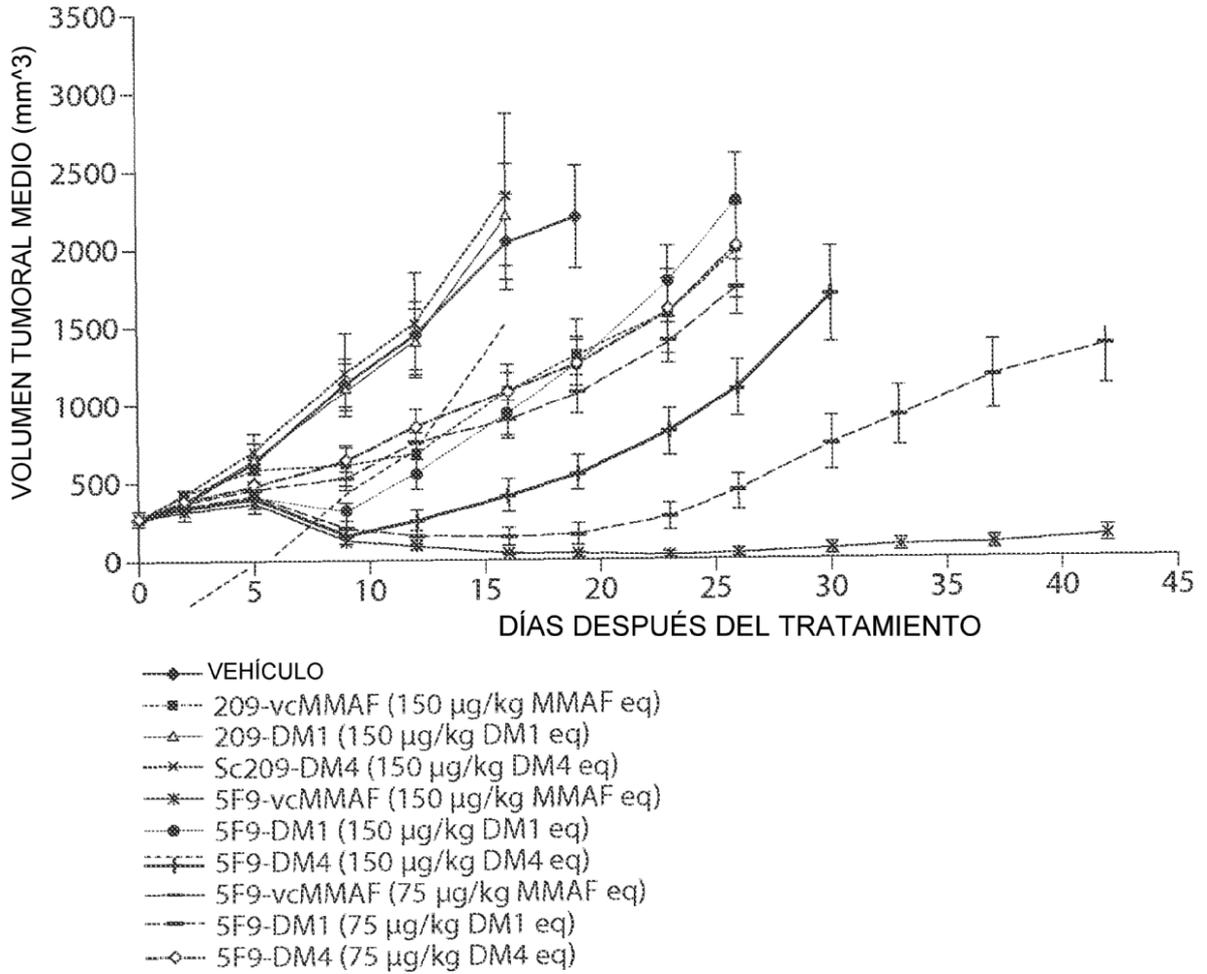


Fig. 1

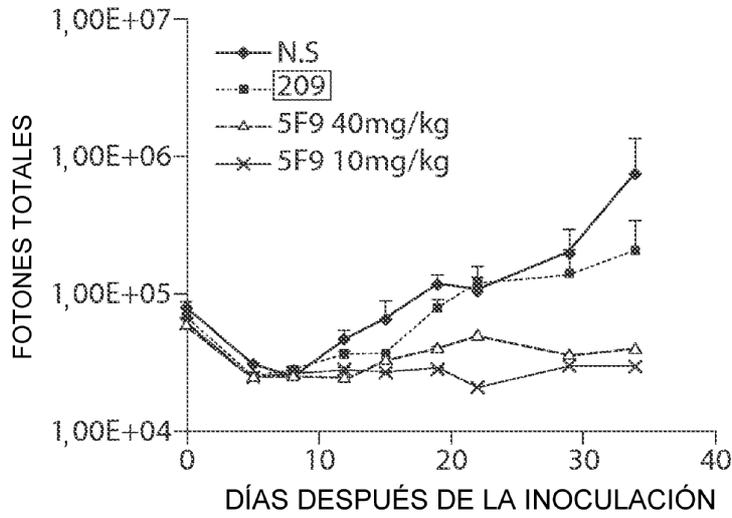
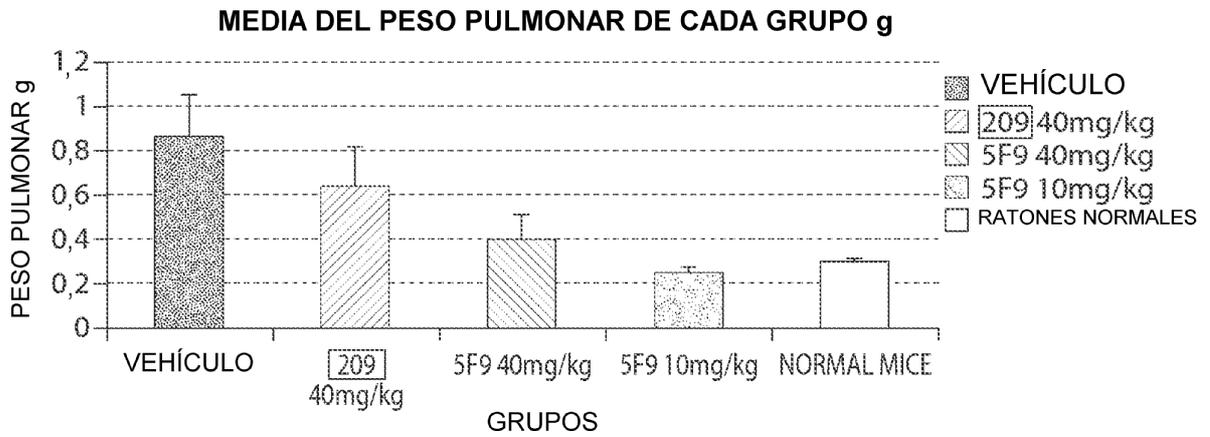


Fig. 2



PRUEBA DE LA T: VEHÍCULO FRENTE A 209 40 mg/kg P = 0,4
 VEHÍCULO FRENTE A 5F9 40 mg/kg P =<0,05
 VEHÍCULO FRENTE A 5F9 10 mg/kg P =<0,01

Fig. 3

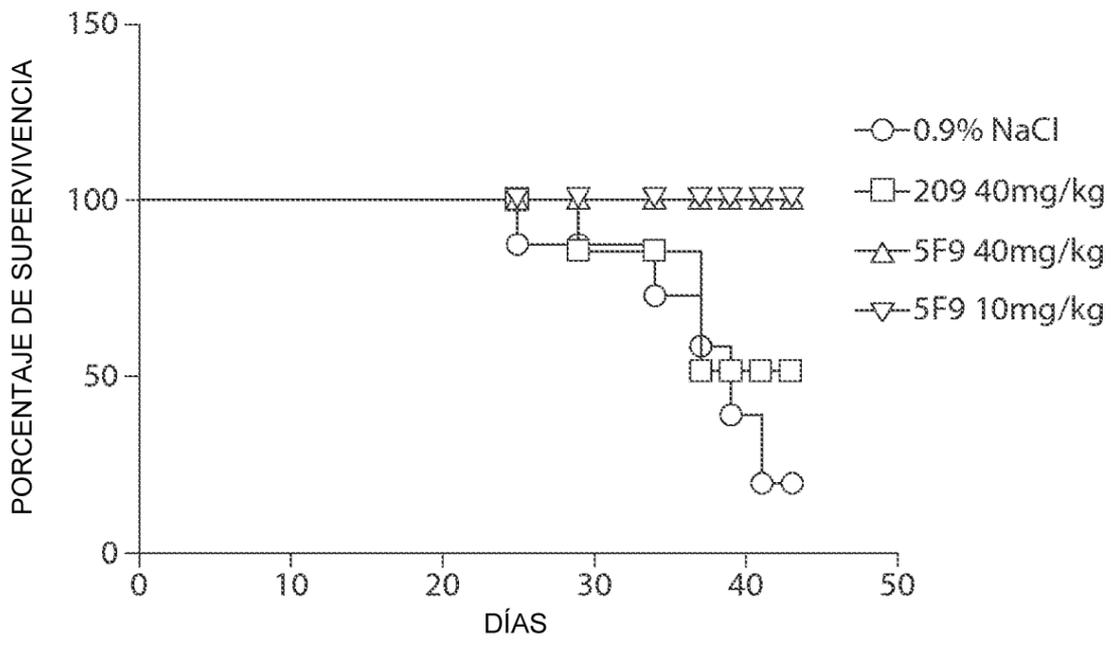


Fig. 4