SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-220722- -00003-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 505

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-058208- -00000-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 505

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA PROPIEDAD INDUSTRIAL

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAL

PATENTE DE INVENCIÓN PCT

EXPEDIENTE:

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
EXPEDIENTARIO

TITULO: MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ANTI-GCC Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

CLASIFICACIÓN: A61K 39/395

SOLICITANTE: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
AMGEN BRITISH COLUMBIA

DOMICILIO: Cambridge, MA, Estados Unidos de América.
Burnaby, BC, Canadá.

APODERADO: MAURICIO PATIÑO BONNET

BOGOTÁ D.C., 18 de marzo de 2014

515

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-220722- -00003-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 505

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-058208- -00000-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 505

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

☐ Conversión ☒ División ☐ Fusión

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del Solicitante

☐ **Persona Natural** ☒ **Persona Jurídica**

MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
AMGEN BRITISH COLUMBIA
Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa ☐ Micro ☐ Pequeña ☐ Mediana ☐ Otra

Documento de identificación: C.C. ☐ C.E. ☐ NIT ☐ Otro ☐ Número _____

Dirección del Representante	Dirección del titular	Ciudad
	40 Landsdowne Street, Cambridge, Massachusetts 02139 Estados Unidos de América **7990 Enterprise Street, Burnaby, BC V5A 1V7, Canadá**	**Cambridge** **Burnaby**
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico

☐ **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

PATIÑO BONNET MAURICIO	**11.342.699**	**73583**
Apellidos y Nombre	**Documento de identificación**	**Tarjeta profesional**

Dirección y Domicilio	Dirección del Titular	Ciudad
Carrera 9 Número 74 – 08 Oficina 403 Bogotá D.C., Colombia		
Dirección electrónica	No. Fax	Número telefónico
patmarks@prietocarrizosa.com	**3268610**	**3268600**

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación. _____

4. Datos del tramite

CONVERSION	DIVISION	FUSIÓN
Expediente No. De: A:	Expediente No. **13 220722** No de Divisionales **1**	Expediente No. Expediente No.

5. Comprobante de pago No. 14-0030003 14-0030005 **Fecha: 18 de marzo de 2014**

6. Anexos

- ☒ Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación.
- ☒ Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación.
- ☐ Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- ☒ Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- ☐ Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma (s)

Firma

MAURICIO PATIÑO BONNET
Nombre y Apellidos

11.342.699
C.C.:

73583
Tarjeta Profesional

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0030003

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2014 - 13:55:26

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A. NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650532945	18/03/2014	1.664.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-******-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: LANDO & ANASTASI, LLP
Solicitud de patente de invención PCT (hasta 10 reivindicaciones) Ref. 80332/1
$ 464.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-058208- -00000-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 505

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-220722- -00003-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 505

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0030005

Bogotá D.C., Marzo 18 de 2014 - 13:55:26

RECIBIDO DE : PRIETO & CARRIZOSA S.A. NI 800.240.450

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	650532945	18/03/2014	1.664.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD INDUSTRIAL	99 OTROS SERVCIOS ADMINISTRATIVOS	922.000.00	922.000.00
				$922.000.00

SON: **NOVECIENTOS VEINTIDOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-********-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

CLIENTE: LANDO & ANASTASI, LLP
32 Reivindicaciones Ref. 80332/1
$ 922.000

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 14-058208- -00000-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 505

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 13-220722- -00003-0000
Fecha: 2014-03-18 16:38:02 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 505

5E

10103-043 PONDER

G.HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA

The undersigned , acting on behalf of and representing of MILLENIUM PHARMACEUTICALS, INC., domiciled in Cambridge, Massachussets, Estados Unidos, hereby appoint(s) LUIS PATIÑO LEYVA and/or GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO and/or, domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia , as our true and legal attorney with the necessary powers:

1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs and models, commercial ensigns and names, trademarks, slogans, health licenses, copyrights and domain names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiff or defendant, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: action dealing with commercial ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nulliry actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to intellectual property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize him to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in on this 6th day of December, 2005
Cambridge, MA, U.S.A.

G. HOLLMANN RESTREPO
ABOGADOS LTDA

Yo (nosotros) , obrando en nombre propio y representación de, con domicilio en , nombre(amos) a LUIS PATIÑO LEYVA y/o GUSTAVO HOLLMANN RESTREPO, con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, apoderado verdadero y legal, con poder especial, amplio y suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósito de nombres y enseñas comerciales, registros sanitarios, derechos de autor y nombres de dominio así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas de nombre o enseña comerciales; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad intelectual; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad intelectual.

A este efecto, lo facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomas todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en el de de .

Millennium Pharmaceuticals, Inc.

BY: Ian R. Silverman
Ian R. Silverman, Associate General Counsel

#36

CERTIFICATION
COMPANIES

The undersigned Diana E. Gentile certifies: that the preceding signature(s) reading Ian R. Silverman is (are) authentic; that the signer(s) at present fill(s) the position of Assistant General of Millenium Pharmaceuticals, Inc., that he (they) is (are) empowered to grant this power; and that said company exists, accomplishes its social object and is organized in Cambridge, MA in accordance with the Laws of Delaware

All the foregoing facts are known to me due to my having examined the respective documents to which I attest.

Signed in Cambridge MA on this 6th day of December of 2005

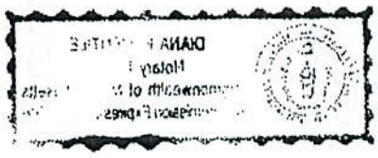
Diana E. Gentile

DIANA E. GENTILE
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires Oct 2006

CERTIFICACIÓN
SOCIEDADES

El(la) infrascrito(a)_____ certifica: que la(s) firma(s) que antecede(n) y dice(n) es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s) desempeña(n) actualmente el cargo(s) de de ; que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y que dicha compañía existe, cumple su objeto social y está organizada en conforme a las Leyes de . Todos los hechos anteriores le constan, por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Firmado en el de de .



I HEREBY CERTIFY THAT THIS
IS THE ORIGINAL DOCUMENT
SAM I SWANK 12.8.05

Subscribed and sworn to before me, in my presence, this
8 day of Dec, 2005 a Notary Public
In and for the District of Columbia

Notary Public

My commission expires 6/14, 2009.

ALBERT L. THEMES
NOTARY PUBLIC DISTRICT OF COLUMBIA
My Commission Expires 6/14/2009

LHT

Apostille

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *District of Columbia*
   United States of America
2. This public document has been signed by ALBERT L. THEMES
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA
4. bears the seal/stamp of ALBERT L. THEMES, NOTARY PUBLIC IN AND FOR THE DISTRICT OF COLUMBIA

CERTIFIED

5. at Washington, D.C.
6. the 12TH day of DECEMBER 2005
7. by *Secretary of the District of Columbia*
8. No. 149773
9. Seal/Stamp



86–P0138

10. Signature

Patricia Elwood (Interim)

Traducción Oficial del Inglés de los sellos, las autenticaciones y la apostilla adjuntas al poder que la compañía MILLENIUM PHARMACEUTICALS INC. domiciliada en Cambridge, Massachussets, Estados Unidos de América, otorga a Luis Patiño Leyva y/o Gustavo Hollmann Restrepo.

[Sello:] DIANA E. GENTILE
Notaria Pública
Estado de Massachusstets
Mi comisión expira Octubre 27/2006

CERTIFICO MEDIANTE LA PRESENTE QUE
ESTE ES EL DOCUMENTO ORIGINAL
SAMI SWANEK 12.8.05

Suscrito y juramentado en mi presencia, el día de hoy 8 de Diciembre de 2005, un Notario Público en y para Washington D.C.

ALBERT L. THEMES
NOTARIO PUBLICO DISTRITO DE COLUMBIA
Mi comisión expira 6/14/2009
(Firma y Sello Oficial)

----------(continúa en la 2ª página)----------

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

1. Distrito de Columbia, Estados Unidos de América
   Este documento público
2. Ha sido firmado por: ALBERT L. THEMES
3. En su calidad de: NOTARIO PUBLICO EN Y PARA EL DISTRITO DE COLUMBIA
4. Y lleva el sello oficial: DE NOTARIO PUBLICO EN Y PARA EL DISTRITO DE COLUMBIA

CERTIFICADO

5. En: Washington D.C.
6. El día: 12 DE DICIEMBRE DE 2005
7. Por: El Secretario del Distrito de Columbia
8. Bajo el No. 149773
9. Sello: SECRETARÍA DISTRITO DE COLUMBIA
10. Firma: Patricia Elwood (Interina)

M. Méndez S.
JOSE MIGUEL MENDEZ
Traductor Oficial
Res. 911 de Mayo 1986 MINJUSTICIA

SUSTITUCIÓN DE PODER

Ref: SOLICITUD DIVISIONAL

Patente de Invención: MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ANTI-GCC Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

Solicitantes: MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
AMGEN BRITISH COLUMBIA

LUÍS PATIÑO LEYVA, mayor de edad, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 2698, atentamente manifiesto a usted, que sustituyo el poder que me ha sido conferido, en la persona del doctor **MAURICIO PATIÑO BONNET**, domiciliado en Bogotá D.C., portador de la tarjeta profesional No. 73583, con las mismas facultades con que me fue otorgado para este caso.

Señor Superintendente,

LUÍS PATIÑO LEYVA
C.C. No. 2.930.616 de Bogotá
T.P. No. 2698

Acepto la sustitución,

MAURICIO PATIÑO BONNET
C.C. No. 11.342.699 de Zipaquirá
T.P. No. 73583

PRIETO & CARRIZOSA S.A.
INTELLECTUAL PROPERTY
POWER OF ATTORNEY

The undersigned Stuart L. Watt, acting on behalf of and representing AMGEN BRITISH COLUMBIA domiciled in 7990 Enterprise Street, Burnaby, British Columbia V5A1V7 Canada hereby appoint(s) MAURICIO PATIÑO, JORGE DI TERLIZZI and MARTÍN CARRIZOSA domiciled in Bogotá D.C., Republic of Colombia, as our true and legal attorneys with the necessary powers:

1) To apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs and models, commercial ensigns and names, trademarks, slogans, health licenses, copyrights and domain names as well as their assignments, extensions, renewals and changes of name; 2) To prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind; 3) To intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: action dealing with commercial ensigns and names; oppositions against trademark registrations; caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements; actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to intellectual property matters.

To this effect, I (we) hereby authorize them to file applications, make descriptions, protests, amendments, declarations, oppositions, cancellations, recordals, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by Law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the above mentioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect my (our) interests, with all other necessary legal faculties, and I (we) hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to my (our) benefit.

PCT/US2010/053686

PRIETO & CARRIZOSA S.A.
PROPIEDAD INTELECTUAL
PODER

Yo (nosotros) _____, obrando en nombre propio y representación de _____, con domicilio en _____, nombro(amos) a MAURICIO PATIÑO, JORGE DI TERLIZZI y MARTÍN CARRIZOSA con domicilio en Bogotá D.C., República de Colombia, apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente:

1) Para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, dibujos y modelos industriales, registro de marcas, registro de lemas comerciales, depósito de nombres y enseñas comerciales, registros sanitarios, derechos de autor y nombres de dominio así como sus traspasos, prórrogas, renovaciones y cambios de nombre; 2) Elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clases; 3) Intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas de nombre o enseña comerciales; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal, demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos, u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad intelectual; al ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad intelectual.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones, inscripción de afectaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la Ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clase de documentos y valores dando al descargo respectivo, y en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomas todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de mis (nuestros) intereses, con todas las facultades necesarias, y por este documento desde ahora declaro(amos) válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieren en mi (nuestro) beneficio.

This power comprises the authority to ratify or confirm on my (our) behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, substituting and revoking substitutions, taking notifications, and appointing judicial or extra-judicial attorneys.

Signed in Thousand Oaks, CA US on this 30th day of March of 2012.

(s) Stuart L. Watt

Name: Stuart L. Watt
Vice President, Law & Intellectual Property Officer

NOTARIAL CERTIFICATE

In the City of _____ on the _____ day of _____ 2012, before me (1)_____ Notary Public practicing in this locality, appeared Mr. or Ms. (2) _____

The undersigned Notary Public hereby Certify that I know he or she personally and that in my opinion he or she has the Legal capacity to enter into contract and to undertake obligations. The above mentioned person declares that he/she appears before me in order to ratify the preceding Power of Attorney. He/She ratify and recognize as their own their respective signatures appearing on said power. Said person who execute the Power of Attorney exhibits before me the document consisting of (5) _____

dated (6)_____

which I have examined. I certify that said document proves that (7) AMGEN BRITISH COLUMBIA

was organized and exists in accordance with the Laws of (8)_____

That its legal domicile is at (9)
7990 Enterprise Street, Burnaby, British Columbia V5A 1V7, Canada

that the management and administration of the company are entrusted to a Board of Directors, which, among other things, has the authority to appoint officers and to grant Powers of -Attorney; and that the acts for which the Power of Attorney has been granted are within those which constitute the social object or main activities of the company, which basically consist in: (10)_____

I further certify that said person is (11)_____

Este poder comprende la facultad de ratificar, o confirmar en mi (nuestro) nombre lo actuado, así como la facultad de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado en _____ el _____ de _____ de _____.

CERTIFICACION NOTARIAL

En la Ciudad de el día de de 2012, ante mí (1) Notario Público ejerciendo en esta lo calidad, comparecieron el Señor (2)

Yo, el suscrito Notario Público, por medio de la presente certifico que los conozco personalmente y que en mi opinión tienen capacidad legal para celebrar contratos y asumir obligacio nes. El primero de los mencionados declara que comparece para ratificar el poder que antecede y tanto él como los citados testigos ratifican y reco nocen como suyas las firmas respecti-vas que aparecen en dicho poder. La misma persona mencionada en primer término exhibe ante mi el documento consistente en (5)

de fecha (6)

que he examinado. Yo certifico que di cho documento prueba que (7)

fue organizada y existe de acuerdo con las Leyes de (8)

que su domicilio legal se encuentra en (9)

que la dirección y administración de la compañía residen en un Consejo de Administración, entre cuyas faculta- des figuran las de nombrar funciona-rios y otorgar poderes; y que los actos para los cuales fue otorgado el Poder están comprendidos entre aquellos que constituyen su objeto social o actividades principales, que, entre otras, son: (10)

Además, certifico que dicho indi viduo es (11)

of the company, in accordance with the appointment made by means of a resolu- tion dated (12)_____

of the Board of Directors which was --elected by the General Shareholders' -Meeting on (13)

_____

as appears from the respective Minutes that I have read. Finally, I certify - that the resolution dated (14)

_____

of the Board of Directors, which I have also read, authorizes said person to grant the preceding Power of Attorney in the name and stead of the Company.

THE PRECEDING POWER OF ATTORNEY IS EXECUTED PURSUANT TO THE APPLICABLE LAWS OF THIS JURISDICTION.

NOTARY PUBLIC (NOTARIO PUBLICO)
NAME:
MY COMMISSION EXPIRES:
(SEAL)

de la sociedad referida, de acuerdo con el nombramiento que mediante reso_lución de fecha (12)

le fue conferido por el Consejo de Ad ministración de la misma, consejo que fue electo por la Asamblea General de Accionistas el dia (13)

según consta del acta respectiva que he leído. Finalmente, certifico que la resolución del Consejo de Adminis-tración, de fecha (14)

que también he leído, faculta a la re_ferida persona para otorgar el poder que antecede a nombre de la sociedad otorgante.

El poder que antecede es otorgado conforme a la legislación applicable de esta jurisdicción

---

NOTARY PUBLIC (NOTARIO PUBLICO)



CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

CIVIL CODE § 1189

State of California
County of Ventura

On March 30, 2012 (Date) before me, Karen E. Podgorny, Notary Public (Here Insert Name and Title of the Officer)

personally appeared Stuart L. Watt (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature: Karen E. Podgorny (Signature of Notary Public)

KAREN E. PODGORNY
Commission # 1906106
Notary Public - California
Ventura County
My Comm. Expires Oct 28, 2014

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: _____

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: _____	Signer's Name: _____
☐ Corporate Officer — Title(s): _____	☐ Corporate Officer — Title(s): _____
☐ Individual	☐ Individual
☐ Partner — ☐ Limited ☐ General	☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
☐ Attorney in Fact	☐ Attorney in Fact
☐ Trustee	☐ Trustee
☐ Guardian or Conservator	☐ Guardian or Conservator
☐ Other: _____	☐ Other: _____
Signer Is Representing: _____	Signer Is Representing: _____
RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER — Top of thumb here	RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER — Top of thumb here

© 2010 National Notary Association • NationalNotary.org • 1-800-US NOTARY (1-800-876-6827)

Item #5907

CORPORATE CERTIFICATE

State of California)
) SS:
County of Ventura)

I, Stuart L. Watt, am the person who signed the foregoing instrument as Vice President, Law, of Amgen Inc., and I hereby certify the following:

1. That Amgen is a corporation duly organized and legally existing under the laws of the State of Delaware and is domiciled at One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320-1799 USA.

2. That I am its legitimate Vice President in accordance with the appointment issued in the City of Los Angeles, California on June 27, 2000, by the Board of Directors of said corporation, which was duly elected by the General Meeting of Stockholders held in Los Angeles, California on May 11, 2000; as evidenced by the minutes, which I have seen, and I have the competence of representing same, including faculties to grant powers.

3. That I am duly authorized to sign the foregoing instrument in the name of said corporation in accordance with my above-mentioned position and/or with a resolution of the Board of Directors of said corporation, which I have seen, taken on June 27, 2000, in the City of Los Angeles, California.

4. That the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the objects or activities of said corporation, in accordance with the Act of Incorporation issued in the City of Dover, Delaware and dated October 31, 1986, and/or the Amended and Restated By-Laws issued in the City of Thousand Oaks, California and dated April 11, 1996, both of which I have seen.

Lynne Hooper
Witness

Kristin Dannacone
Witness

Stuart L. Watt
Stuart L. Watt
Vice President, Law

State of California)
)
County of Ventura) SS:

On this _30___ day of March, 2012, before me, Karen E. Podgorny, Notary Public, personally appeared Stuart L. Watt, Vice President, Law, who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person whose name is subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she executed the same in his/her authorized capacity, and that by his/her signature on the instrument the person, or the entity upon behalf of which the person acted, executed the instrument.

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Witness my hand and seal.

Karen E. Podgorny
Notary Public

KAREN E. PODGORNY
Commission # 1906106
Notary Public - California
Ventura County
My Comm. Expires Oct 28, 2014

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ANTI-GCC Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

SOLICITUDES RELACIONADAS

[001] La presente solicitud invoca el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N°. 61/254.474, presentada el 23 de octubre, 2009. Los contenidos completos de la Solicitud Provisional de Patente de los EE.UU. N°Acta: 61/254.474 se incorporan en la presente a modo de referencia.

LISTADO DE SECUENCIAS

[001.1] La presente solicitud contiene un Listado de Secuencias que ha sido presentado en formato ASCII a través de EFS-Web y que se incorpora a modo de referencia en su totalidad. Dicha copia ASCII , creada el 21 de octubre de 2010, se denomina M2051702.txt y tiene un tamaño de 165.791 bytes .

CAMPO DE LA INVENCIÓN

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

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[003] La guanililo ciclasa C (GCC) es un receptor transmembrana de la superficie celular que funciona en el mantenimiento de los fluidos intestinales, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular, véase, por ejemplo, Carrithers et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3018-3020 (2003). La GCC se expresa en las células del revestimiento de la mucosa del intestino delgado, del intestino grueso y del recto (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181

(1996)). La expresión GCC se mantiene con la transformación neoplásica de células del epitelio intestinal, presentando expresión en todos los tumores primarios y metastásicos colorrectales (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)).

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[004] Los inventores han descubierto numerosos anticuerpos anti-GCC, incluyendo anticuerpos humanos y de murinos. Por lo tanto, en un aspecto, la invención está dirigida a una molécula de anticuerpo anti-GCC, divulgada en la presente. Las moléculas de anticuerpo anti-GCC son de utilidad como moléculas de anticuerpo desnudas y como componentes de inmunoconjugados. Por lo tanto, en otro aspecto, la invención está dirigida a inmunoconjugados que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC y una marca o agente terapéutico. La invención también está dirigida a composiciones farmacéuticas que comprenden las moléculas de anticuerpo anti-GCC y los inmunoconjugados que se describen en la presente. La invención también está dirigida a métodos para usar las moléculas de anticuerpo anti-GCC y los inmunoconjugados que se describen en la presente en la detección de GCC y de células o tejidos que expresan GCC; para el diagnóstico, la prognosis, el diagnóstico por imágenes o la determinación de etapas de una enfermedad mediada por GCC; para modular una actividad o función de una proteína GCC; y para el tratamiento de una enfermedad mediada por GCC, según se describe en la presente. En otro aspecto, la invención también está dirigida a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifica secuencias de aminoácidos de una molécula de anticuerpo anti-

GCC, así como vectores y células huésped que comprenden dichos ácidos nucleicos, y métodos para producir moléculas de anticuerpo anti-GCC.

[005] Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas aquí se incorporan por completo en la presente a modo de referencia.

[006] Otras características, objetos y ventajas de la invención divulgada en la presente resultarán evidentes a partir de la descripción y las figuras, y a partir de las reivindicaciones.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[007] La Figura 1 ilustra el crecimiento tumoral en ratones SCID portadores de 293-GCC N° 2 tratadas con 5F9vc-MMAF, -DM1 y -DM4 según un programa q14d.

[008] La Figura 2 ilustra el peso de los pulmones de ratones tratadas con NaCl 0,9%; anticuerpo 209 a 40 mg/kg; o anticuerpo 5F9 a 10 ó 40 mg/kg el día 41 p.i.

[009] La Figura 3 ilustra la curva de sobrevida de ratones portadores de tumores CT26-hGCC tratadas con el anticuerpo 5F9.

[010] La Figura 4 ilustra ensayos de unión ELISA para evaluar la reactividad cruzada de anticuerpos de ortólogos GCC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Guanililo Ciclasa C

[011] La guanililo ciclasa C (GCC) (también conocida como STAR, receptor ST, GUC2C y GUCY2C) es un receptor transmembrana de la superficie celular que funciona en el mantenimiento de los fluidos intestinales, 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)); GenBank, N° Acceso NM_004963, cada un a de las cuales se incorpora en la presente a modo de referencia). Esta función está mediada por la unión de guanilina (Wiegand et al. *FEBS Lett.* 311:150-154 (1992)). La GCC también es un receptor para la enterotoxina estable al calor (ST, por ejemplo, que tiene la secuencia de aminoácidos de NTFYCCELCCNPACAGCY, SEQ ID N°: 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.

[012] A continuación se muestra la secuencia de nucleótidos para la GCC humana (GenBank, N°Acceso NM_004963):

1 atgaagacgt tgctgttgga cttggctttg tggtcactgc tcttccagcc cgggtggctg

61 tcctttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg

121 atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag

181 gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct

241 actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg actgccggag tagcacctgt

301 gaaggcctcg acctactcag gaaaatttca aatgcacaac ggatgggctg tgtcctcata

361 gggccctcat gtacatactc caccttccag atgtaccttg acacagaatt gagctacccc

421 atgatctcag ctggaagttt tggattgtca tgtgactata aagaaacctt aaccaggctg

481 atgtctccag ctagaaagtt gatgtacttc ttggttaact tttggaaaac caacgatctg

541 cccttcaaaa cttattcctg gagcacttcg tatgtttaca agaatggtac agaaactgag

601 gactgtttct ggtaccttaa tgctctggag gctagcgttt cctatttctc ccacgaactc

661 ggctttaagg tggtgttaag acaagataag gagtttcagg atatcttaat ggaccacaac
721 aggaaaagca atgtgattat tatgtgtggt ggtccagagt tcctctacaa gctgaagggt
781 gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac
841 tttgaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct
901 cctgggaatt cccttctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac
961 tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt
1021 gaaaatggag aaaatattac cacccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt
1081 gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg
1141 cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgatacccac
1201 gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt
1261 cctaatgata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact
1321 ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgct ctcctgatgc tcagaaaata tagaaaagat
1381 tatgaacttc gtcagaaaaa atggtcccac attcctcctg 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 cttcggggtg
1681 atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttcctaccct
1741 gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga
1801 atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc
1861 gtagtggaca gtagaatggt ggtgaagatc actgattttg gctgcaattc cattttacct
1921 ccaaaaaagg acctgtggac agctccagag cacctccgcc aagccaacat ctctcagaaa
1981 ggagatgtgt acagctatgg gatcatcgca caggagatca tcctgcggaa agaaaccttc
2041 tacactttga gctgtcggga ccggaatgag aagattttca gagtggaaaa ttccaatgga
2101 atgaaaccct tccgcccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg

2161 tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttcaaaaaa

2221 attgagacta cacttgccaa gatatttgga ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat

2281 atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag

2341 gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg

2401 cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat

2461 gaggaagtta caatctactt cagtgacatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc

2521 acccccatgg aagtggtgga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattgtt

2581 gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggtgatg cgtacatggt ggctagtggt

2641 ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc

2701 ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttcctg gcctcccaat atggattcgc

2761 attggagttc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat

2821 tgtctatttg gagatacggt caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg

2881 agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt

2941 tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg

3001 actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaacccctc ctactgtgga gaatcaacag

3061 cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccaactctt tacagaaaag acaggcagca

3121 gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac

3181 ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctattttt aa

(SEQ ID Nº: 227)

[013] A continuación se muestra la secuencia de aminoácidos para la GCC humana (GenPept, N°Acceso NP_004954):

1 mktllldlal wsllfqpgwl sfssqvsqnc hngsyeisvl mmgnsafaep lknledavne

61 gleivrgrlq naglnvtvna tfmysdglih nsgdcrsstc egldllrkis naqrmgcvli

121 gpsctystfq myldtelsyp misagsfgls cdyketltrl msparklmyf lvnfwktndl

181 pfktyswsts yvyknglete dcfwylnale asvsyfshel gfkvvlrqdk efqdilmdhn

241 rksnviimcg gpeflyklkg dravaedivi ilvdlfndqy fednvtapdy mknvlvltls
301 pgnsllnssf srnlsptkrd falaylngil lfghmlkifl engenittpk fahafrnltf
361 egydgpvtld dwgdvdstmv llytsvdtkk ykvlltydth vnktypvdms ptftwknskl
421 pnditgrgpq ilmiavftlt gavvllllva llmlrkyrkd yelrqkkwsh ippenifple
481 tnetnhvslk idddkrrdti qrlrqckydk krvilkdlkh ndgnftekqk ielnkllqid
541 yynltkfygt vkldtmifgv ieycergslr evlndtisyp dgtfmdwefk isvlydiakg
601 msylhsskte vhgrlkstnc vvdsrmvvki tdfgcnsilp pkkdlwtape hlrqanisqk
661 gdvysygiia qeiilrketf ytlscrdrne kifrvensng mkpfrpdlfl etaeekelev
721 yllvkncwee dpekrpdfkk iettlakifg lfhdqknesy mdtlirrlql ysrnlehlve
781 ertqlykaer dradrlnfml lprlvvkslk ekgfvepely eevtiyfsdi vgfttickys
841 tpmevvdmln diyksfdhiv dhhdvykvet igdaymvasg lpkrngnrha idiakmalei
901 lsfmgtfele hlpglpiwir igvhsgpcaa gvvgikmpry clfgdtvnta srmestglpl
961 rihvsgstia ilkrtecqfl yevrgetylk grgnettywl tgmkdqkfnl ptpptvenqq
1021 rlqaefsdmi anslqkrqaa girsqkprrv asykkgtley lqlnttdkes tyf
(SEQ ID Nº: 228)

[014] La proteína GCC contiene algunos dominios aceptados en general, cada uno de los cuales contribuye con una función separada en la molécula de GCC. Las porciones de GCC incluyen una secuencia señal (para dirigir la proteína a la superficie celular) entre el residuo de aminoácido 1 y el residuo 23 aproximadamente, o entre el residuo 1 y el residuo 21 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228 (recortada en la maduración para dar la proteína madura funcional entre el residuos de aminoácidos 22 ó 24 y 1073 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228), un dominio e xtracelular para la unión al ligando, por ejemplo, guanilina o ST, entre el residuo de aminoácido 24 aproximadamente y el residuo 420 aproximadamente, o entre el residuo 54

aproximadamente y el residuo 384 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228, un dominio transmembrana entre el residuo de aminoácido 431 aproximadamente y el residuo 454 aproximadamente o entre el residuo 436 aproximadamente y el residuo 452 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228, un dominio de homología con quinasa, de actividad tirosina quinasa predicha entre el residuo de aminoácido 489 aproximadamente y el residuo 749 aproximadamente, o entre el residuo 508 aproximadamente y el residuo 745 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228 y un dominio catalítico guanililo ciclasa entre el residuo 750 aproximadamente y el residuo 1007 aproximadamente, o entre el residuo 816 aproximadamente y el residuo 1002 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228.

[015] En tejidos humanos normales, la GCC se expresa en las células de la mucosa, por ejemplo, en las membranas de borde en cepillo apicales, en el revestimiento del intestino delgado, del intestino grueso y del recto (Carrithers et al., *Dis Colon Rectum* 39: 171-181 (1996)). La expresión GCC se mantiene con la transformación neoplásica de células del epitelio intestinal, presentando expresión en todos los tumores primarios y metastásicos colorrectales (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, esófago y la unión gastroesofágica también expresan GCC (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. Nº: 6.767.704; Debruine et al. *Gastroenterology* 130: 1191-1206 (2006)). Se puede aprovechar la expresión específica de tejidos y la asociación con el cáncer, por ejemplo, de origen gastrointestinal, (por ejemplo, cáncer de colon, cáncer de estómago o cáncer de esófago), para el uso de GCC como un marcador de diagnóstico para esta enfermedad (Carrithers et al.,

Dis Colon Rectum 39: 171-181 (1996); Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005)).

[016] Como una proteína de la superficie celular, la GCC también puede servir como un blanco terapéutico para las proteínas de unión a receptores tales como anticuerpos o ligandos. En el tejido intestinal normal, la GCC se expresa sobre el lado apical de las uniones estrechas de las células epiteliales que forman una barrera impermeable entre el entorno luminal y el compartimento vascular (Almenoff et al., *Mol Microbiol* 8: 865-873); Guarino et al., *Dig Dis Sci* 32: 1017-1026 (1987)). Como tal, la administración intravenosa sistémica de una proteína terapéutica de unión a GCC tendrá un efecto mínimo sobre los receptores intestinales de GCC, al tiempo que tienen acceso a las células neoplásicas del sistema gastrointestinal, incluyendo células de cáncer de colon invasivas o metastásicas, tumores de colon extraintestinales o metastásicos, tumores de esófago o tumores de estómago, adenocarcinoma en la unión gastroesofágica. Además, la GCC es internalizada por endocitosis mediada por receptores luego de la unión al ligando (Buc et al. *Eur J Cancer* 41: 1618-1627 (2005); Urbanski et al., *Biochem Biophys Acta* 1245: 29-36 (1995)).

[017] Los anticuerpos policlonales generados contra el dominio extracelular de GCC (Nandi et al., *Protein Expr. Purif.* 8: 151-159 (1996)) inhibieron al unión del péptido ST a la GCC humana y de rata e inhibieron la producción de GMPc mediada por ST por la GCC humana.

[018] La GCC se ha caracterizado como una proteína relacionada con distintos tipos de cáncer, incluyendo distintos tipos de cáncer 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). Las terapias con moléculas de anticuerpos dirigidas a GCC se pueden usar solos en una forma no conjugada para así inhibir las células cancerosas que expresan GCC. Las moléculas de anticuerpo anti-GCC de la invención se pueden unir a la GCC humana. En algunas formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede inhibir la unión de un ligando, por ejemplo, guanilina o enterotoxina estable al calor, a la GCC. En otras formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención no inhibe la unión de un ligando, por ejemplo, guanilina o enterotoxina estable al calor, a la GCC.

[019] 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)). El GCC:B10 tiene una cadena liviana kappa y un isotipo IgG2a y presenta reacción cruzada con la GCC de rata, cerdo y mono. El GCC:B10 se une a los primeros 63 aminoácidos del dominio intracelular de GCC, específicamente a los residuos 470-480 de la SEQ ID Nº: 228 (Nandi et al. *Protein Sci.* 7:2175-2183 (1998)). El GCC:4D7 se une al dominio de homología con quinasa, dentro de los residuos 491-568 de la GCC (Bhandari et al. *Biochemistry* 40: 9196-9206 (2001)). El GCC:C8 se une al dominio tipo proteína quinasa en la porción citoplasmática de la GCC.

Definiciones y Métodos

[020] A menos que se defina de otra forma en la presente, los términos científicos y técnicos que se usan en conexión con la presente invención tienen

los significados comúnmente aceptados por las personas con experiencia en el arte. Por lo general, la nomenclatura que se utiliza en conexión con, y las técnicas de cultivos de células y de tejidos, biología molecular y química e hibridización de proteínas y oligo- o polinucleótidos que se describen en la presente, son las que se conocen en el arte. Los números de acceso a GenBank o GenPept y las secuencias de ácidos nucleicos y péptidos útiles se pueden encontrar en el sitio web mantenido por el National Center for Biotechnological Information, Betesda MD. Se usan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo de tejidos y transformación y transfección (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se llevan a cabo de acuerdo a las especificaciones del fabricante o como comúnmente se las lleva a cabo en el arte o como se las describe en la presente. Las técnicas y procedimientos precedentes por lo general se llevan a cabo de acuerdo a métodos conocidos en el arte, por ejemplo, como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y se exponen a lo largo de la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ra ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)) o véase en general, Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. Las nomenclaturas que se utilizan en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química de síntesis orgánica, y química medicinal y farmacéutica que se describen en la presente son conocidas en el arte. Se usan técnicas estándar para síntesis química, análisis químico, preparación

farmacéutica, formulación, y administración, y tratamiento de pacientes. Más aun, a menos que el contexto lo requiera de otra forma, los términos en singular deberán incluir pluralidades y los términos en plural deberán incluir al singular.

[021] Como se usa en la presente, el término "molécula de anticuerpo" se refiere a un anticuerpo, péptido(s) de anticuerpo o inmunoglobulina, o a un fragmento de unión a antígeno o a cualquiera de los precedentes, por ejemplo, de un anticuerpo. Las moléculas de anticuerpo incluyen a moléculas de anticuerpo de cadena simple, por ejemplo, scFv, véase por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883), y moléculas de anticuerpo de dominio simple, véase, por ejemplo, WO9404678. A pesar de que no dentro del término "moléculas de anticuerpo," la invención también incluye a "análogo(s) de anticuerpo," otros esqueletos de molécula de no anticuerpo a base de proteínas, por ejemplo, proteínas de fusión y/o inmunoconjugados que usan CDRs para proveer unión a antígeno específica.

[022] Una "molécula de anticuerpo anti-GCC" se refiere a una molécula de anticuerpo (o sea, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo o análogo de anticuerpo) que interacciona con o reconoce a, por ejemplo, une a (por ejemplo, une específicamente) GCC, por ejemplo, GCC humana. Los ejemplos de moléculas de anticuerpo anti-GCC son tales como los que se resumen en las Tablas 1 y 2.

[023] Como se usa en la presente, el término "anticuerpo," "péptido(s) de anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a proteínas y glicoproteínas de simple cadena, de dos cadenas, y de multicadena. El término anticuerpo

incluye a anticuerpos policlonales, monoclonales, quiméricos, CDR-injertados y humanos o humanizados, todos los cuales se exponen en más detalle en algún lado de la presente. También se incluyen dentro del término los anticuerpos de camélido, véase, por ejemplo, US2005/0037421, y nanobodies, por ejemplo, IgNARs (anticuerpos de tiburón), véase, por ejemplo, WO03/014161. El término "anticuerpo" también incluye variantes sintéticas y modificadas genéticamente.

[024] Como se usa en la presente, el término "fragmento de anticuerpo" o "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo se refiere a, por ejemplo, fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$, y Fv, anticuerpos de simple cadena, anticuerpos de cadena pesada funcional (nanobodies), así como también cualquier porción de un anticuerpo que tenga especificidad hacia al menos un epitope deseado, que compita con el anticuerpo intacto por la unión específica (por ejemplo, un fragmento que tenga secuencias CDR suficientes y que tenga secuencias de esqueleto suficientes de modo de unir específicamente a un epitope). Por ejemplo, un fragmento de unión a antígeno puede competir por la unión a un epitope que se une al anticuerpo del que deriva el fragmento. Derivado, como se lo usa en este y en contextos similares, no implica ningún método o proceso de derivación particular, sino que se puede referir simplemente a similitud de secuencia. Los fragmentos de unión a antígeno se pueden producir mediante técnicas recombinantes, o mediante clivado enzimático o químico de un anticuerpo intacto. El término fragmento de unión a antígeno, cuando se usa con una cadena simple, por ejemplo, una cadena pesada, de un anticuerpo que tiene una cadena liviana y pesada, significa que el fragmento de la cadena es suficiente de modo que cuando se aparea con una región variable completa de otra cadena, por ejemplo, la cadena liviana, permitirá la unión de al menos 25,

50, 75, 85 o 90% de la misma viendo como un todo a la región variable pesada y liviana.)

[025] El término, "constelación de CDRs de unión a antígeno" o "un numero de CDRs suficientes para permitir la unión" (y lenguaje similar), como se usa en la presente, se refiere a las CDRs suficientes de una cadena, por ejemplo, la cadena pesada, de modo que cuando se las coloca en un esqueleto y se las aparea con una región variable completa de la otra cadena, o con una porción de región variable de otras cadenas de longitud similar y que tienen el mismo número de CDRs, por ejemplo, la cadena liviana, permitirán la unión, por ejemplo, de al menos 25, 50, 75, 85 o 90% de la misma viendo como un todo a la región variable pesada y liviana.

[026] Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humano" incluye un anticuerpo que posee una secuencia que deriva de una secuencia de inmunoglobulina de línea germinal humana, tal como un anticuerpo que deriva de ratones transgénicos que tienen genes de inmunoglobilina humanos (por ejemplo, ratones modificados genéticamente XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, CA)), bibliotecas humanas de exposición en fago, células de mieloma humanas, o células B humanas.

[027] Como se usa en la presente, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo que deriva de un anticuerpo no humano por ejemplo, de roedor (por ejemplo, murino) que retiene o sustancialmente retiene las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo parental pero es menos inmunogénico en humanos. Humanizado, como se usa en la presente tiene la intención de incluir anticuerpos desinmunizados. Los anticuerpos humanizados

típicos incluyen CDRs no humanas, y esqueletos y regiones constantes humanas o derivadas de humanos.

[028] El término anticuerpo "modificado", como se usa en la presente, se refiere a anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan mediante medios recombinantes, tal como anticuerpos que se expresan usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos combinatoria recombinante, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón, oveja o cabra) que es transgénico para genes de inmunoglobilina humanos o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro método que involucre el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos modificados incluyen anticuerpos humanizados, CDR injertados (por ejemplo, un anticuerpo que tiene CDRs de un primer anticuerpo y una región de esqueleto de una fuente diferente, por ejemplo, un segundo anticuerpo o un esqueleto consenso), quiméricos, generados *in vitro* (por ejemplo, mediante exposición en fagos), y opcionalmente pueden incluir regiones variables o constantes que derivan de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana o genes de inmunoglobilina humanos o anticuerpos que se han preparado, expresado, creado o aislado mediante cualquier método que involucre el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina humana con secuencias de inmunoglobulinas alternativas. En formas de realización una molécula de anticuerpo modificada incluye una molécula de anticuerpo que tiene un cambio de secuencia a partir de un anticuerpo de referencia.

[029] El término "anticuerpo monoespecífico" se refiere a un anticuerpo o preparación de anticuerpo que muestra una especificidad de unión y una afinidad simple por un epitope particular. Este término incluye un "anticuerpo monoclonal" o "composición de anticuerpo monoclonal."

[030] El término "anticuerpo biespecífico" o "anticuerpo bifuncional" se refiere a un anticuerpo que exhibe una especificidad de unión dual para dos epitopes, en donde cada sitio de unión difiere y reconoce un epitope diferente.

[031] Los términos "anticuerpo no conjugado" y "anticuerpo desnudo" se usan en forma intercambiable para expresar una molécula de anticuerpo que no está conjugada con un grupo no anticuerpo, por ejemplo, un agente terapéutico o un rótulo.

[032] Los términos "immunoconjugado", "anticuerpo conjugado", "anticuerpo conjugado con droga", y "ADC" se usan en forma intercambiable y se refieren a un anticuerpo que está conjugado a un grupo no anticuerpo, por ejemplo, un agente terapéutico o un rótulo.

[033] El término "agente" se usa en la presente para designar a un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto hecho de materiales biológicos. El término "agente terapéutico" se refiere a un agente que tiene actividad biológica.

[034] El término "agente anti-cáncer" o "agente quimioterapéutico" se usa en la presente para referirse a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o progresión de un neoplasma en un humano, en particular una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de metástasis o angiogénesis con frecuencia es una propiedad de los agentes anti-cáncer o quimioterapéuticos. Un agente

quimioterapéutico puede ser un agente citotóxico o citostático. El término "agente citostático" se refiere a un agente que inhibe o suprime el crecimiento celular y/o la multiplicación de células.

[035] Los "agentes citotóxicos" se refieren a compuestos que causan la muerte celular primariamente mediante interferencia directa con el funcionamiento celular, incluyendo, pero no como limitación, agentes alquilantes, inhibidores de factor de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de microtúbulos, inhibidores de quinasa, inhibidores de proteasoma e inhibidores de topoisomerasa. Una "carga tóxica", como se usa en la presente, se refiere a una cantidad suficiente de agente citotóxico que, cuando se la administra a una célula, resulta en muerte celular. La administración de una carga tóxica se puede llevar a cabo mediante la administración de una cantidad suficiente de inmunoconjugado que comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención y un agente citotóxico. La administración de una carga tóxica también se puede llevar a cabo mediante la administración de una cantidad suficiente de un inmunoconjugado que comprende un agente citotóxico, en donde el inmunoconjugado comprende un anticuerpo secundario o fragmento de unión a antígeno que el mismo reconoce y se une a un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno de la invención.

[036] Como se usa en la presente la frase, una secuencia "que deriva de" o "específica para una secuencia designada" se refiere a una secuencia que comprende una secuencia contigua de aproximadamente al menos 6 nucleótidos o al menos 2 aminoácidos, al menos aproximadamente 9 nucleótidos o al menos 3 aminoácidos, al menos aproximadamente entre 10 y 12 nucleótidos o 4 aminoácidos, o al menos aproximadamente entre 15 y 21

nucleótidos o entre 5 y 7 aminoácidos correspondientes, o sea, idénticos o complementarios a, por ejemplo, una región contigua de la secuencia designada. En ciertas formas de realización, la secuencia comprende toda una secuencia designada de nucleótidos o aminoácidos. La secuencia puede ser complementaria (en el caso de una secuencia polinucleotídica) o idéntica a una región de secuencia que es única de una secuencia particular, según se determina mediante técnicas conocidas en el arte. Las regiones de las que derivan las secuencias incluyen, pero no como limitación, regiones que codifican para epitopes específicos, regiones que codifican para CDRs, regiones que codifican para secuencias de esqueleto, regiones que codifican para regiones de dominio constante, regiones que codifican para regiones de domino variable, así como también regiones no traducidas y/o no transcriptas. La secuencia derivada no será necesariamente derivada físicamente de la secuencia de interés bajo estudio, pero se puede generar de cualquier forma, incluyendo, pero no como limitación, síntesis química, replicación, transcripción reversa o transcripción, en base a la información provista por la secuencia de bases en la(s) región(es) de la(s) que deriva el polinucleótido. Como tal, la misma puede representar ya sea una orientación sentido o una antisentido del polinucleótido original. Además, se pueden modificar o hacer combinaciones de regiones que corresponden a la de la secuencia designada en formas conocidas en el arte para ser consistentes con el uso intentado. Por ejemplo, una secuencia puede comprender dos o más secuencias contiguas en donde cada una comprende parte de una secuencia designada, y que están interrumpidas por una región que no es idéntica a la secuencia designada pero que intenta representar una secuencia que deriva de la secuencia designada.

Con respecto a las moléculas de anticuerpo, "derivada de la misma" incluye a una molécula de anticuerpo que está funcionalmente o estructuralmente relacionada con un anticuerpo de comparación, por ejemplo, "derivada de la misma" incluye a una molécula de anticuerpo que tiene similar o sustancialmente la misma secuencia o estructura, por ejemplo, que tiene las mismas o similares CDRs, esqueleto o regiones variables. "Derivado de la misma" para un anticuerpo también incluye residuos, por ejemplo, uno o más, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6 o más residuos, que pueden ser contiguos o no, pero que se definen o identifican de acuerdo a un esquema de numeración u homología con una estructura general de anticuerpo o proximidad tridimensional, o sea, dentro de un CDR o de una región de esqueleto, de un secuencia de comparación. El término "derivado de la misma" no se limita a físicamente derivado de la misma, si no que incluye su generación mediante cualquier forma, por ejemplo, mediante el uso de información de secuencia de un anticuerpo de comparación para diseñar otro anticuerpo.

[037] Como se usa en la presente, la frase "codificado por" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que codifica para una secuencia polipeptídica, en donde la secuencia polipeptídica o una porción de la misma contiene una secuencia de aminoácidos de al menos entre 3 y 5 aminoácidos, al menos entre 8 y 10 aminoácidos, o al menos entre 15 y 20 aminoácidos de un polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos.

[038] Los cálculos de "homología" entre dos secuencias se pueden llevar a cabo como sigue. Se alinean las secuencias para propósitos de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir faltas de coincidencia en una o en ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o

HOJA EN BLANCO

de ácidos nucleicos para alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas se pueden dejar de lado para propósitos de comparación). La longitud de una secuencia de referencia que se alinea con propósitos de comparación es al menos 30%, 40%, o 50%, al menos 60%, o al menos 70%, 80%, 90%, 95%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia. Luego se comparan los residuos de aminoácido o nucleótidos en las posiciones de aminoácido o de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que en la posición correspondiente de la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en la presente, "identidad" de aminoácido o de ácido nucleico es equivalente a "homología" de aminoácido o de ácido nucleico amino). La identidad porcentual entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de no coincidencias, y la longitud de cada no coincidencia que se necesita introducir para un alineamiento óptimo de las dos secuencias.

[039] La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de homología entre dos secuencias se puede llevar a cabo usando un algoritmo matemático. El porcentaje de homología entre dos secuencias de aminoácidos se puede determinar usando cualquier método conocido en el arte. Por ejemplo, el algoritmo de Needleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453 (1970), que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de programas GCG, usando o bien la matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de no coincidencia de 16, 14, 12, 10, 8, 6, o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. El porcentaje de homología entre dos secuencias de

nucleótidos también se puede determinar usando el programa GAP del paquete de programas GCG (Accelerys, Inc. San Diego, CA), usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de no coincidencia de 40, 50, 60, 70, u 80 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5, o 6. Un ejemplo de grupo de parámetros para la determinación de homología es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalidad por no coincidencia de 12, una penalidad por extensión de no coincidencia de 4, y una penalidad por no coincidencia por corrimiento de marco 5.

[040] Como se usa en la presente, el término "hibridiza bajo condiciones exigentes" describe condiciones para hibridización y lavado. Una guía para llevar a cabo reacciones de hibridización se puede encontrar en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esa referencia se describen métodos acuosos y no acuosos y se puede usar cualquiera. Las condiciones de hibridización específicas a las que se hace referencia en la presente son como sigue: 1) condiciones de hibridización de baja exigencia en cloruro de sodio 6X /citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por dos lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% al menos a 50°C (la temperatura de los lavados se puede incrementar a 55°C para condiciones de baja exigencia); 2) condiciones de hibridización de exigencia media en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 0,1% a 60°C; 3) condiciones de hibridización de alta exigencia en SSC 6X a aproximadamente 45°C, seguido por uno o más lavados en SSC 0,2X, SDS al 01% a 65°C; y 4) condiciones de hibridización de muy alta exigencia son fosfato de sodio 0,5 M, SDS al 7% a 65°C, seguido por uno o más lavados a SSC 0,2X, SDS al 1% a 65°C. Las condiciones de muy

alta exigencia (4) con frecuencia son las condiciones preferidas y las que se deberían usar a menos que se especifique de otro modo.

[041] Se comprende 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 sobre las funciones del polipéptido. Se puede determinar si una sustitución particular será tolerada o no, o sea, que no afectará adversamente las propiedades biológicas deseadas, tales como la actividad de unión, 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 aminoácido conservativa" es una en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales similares se han definido en el arte. Estas familias incluyen a aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales acidas (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 ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

[042] Un residuo de aminoácido "no esencial" es un residuo que se puede alterar a partir de la secuencia de tipo salvaje del agente de unión, por ejemplo, el anticuerpo, sin abolir o, sin alterar sustancialmente una actividad biológica, mientras que un residuo de aminoácido "esencial" resulta en dicho

cambio. En un anticuerpo, un residuo de aminoácido esencial puede ser un residuo determinante de especificidad (SDR).

[043] Como se usa en la presente, el término "aislado" se refiere a material que se elimina de su entorno original (por ejemplo, el entorno natural si es de origen natural). Por ejemplo, un polinucleótido o polipéptido de origen natural presente en un animal viviente no está aislado, pero el mismo polinucleótido o ADN o polipéptido, separado de alguno o todos los materiales coexistentes en el sistema natural, está aislado. Dicho polinucleótido podría ser parte de un vector y/o dicho polinucleótido o polipéptido podría ser parte de una composición, por ejemplo, una mezcla, solución o suspensión o que comprende una célula aislada o una célula cultivada que comprende el polinucleótido o polipéptido, y aun estaría aislado en el sentido en que el vector o composición no es parte de su entorno natural.

[044] Como se usa en la presente, 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 polinucleótidos dentro de una célula.

[045] Como se usa en la presente, el término "ligado en forma operable" se refiere a una situación en donde los componentes descritos están en una relación que les permite funcionar en la manera esperada. Por lo tanto, por ejemplo, una secuencia control "ligada en forma operable" a una secuencia codificante está ligada de manera tal que la expresión de la secuencia codificante se consigue bajo condiciones compatibles con la secuencia control.

[046] Como se usa en la presente, el término "vector" se refiere a un replicón al que se une otro segmento de polinucleótidos, de forma de conseguir la replicación y/o expresión del segmento unido.

[047] Como se usa en la presente, el término "secuencia control" se refiere a una secuencia polinucleotídica que es necesaria para efectuar la expresión de una secuencia codificante a la que está ligada. La naturaleza de dichas secuencias control difiere dependiendo del organismo huésped. En procariotas, dichas secuencias control por lo general incluyen un promotor, un sitio de unión a ribosomas y terminadores y, en algunos casos, potenciadores. El término "secuencia control" por lo tanto intenta incluir al mínimo todos los componentes cuya presencia es necesaria para la expresión, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias líder.

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

[049] Como se usa en la presente, el término "epitope" se refiere a una proteína determinada capaz de unir específicamente a un anticuerpo. Los determinantes epitópicos usualmente consisten en agrupamientos de moléculas de superficie activos químicamente tales como cadenas laterales de aminoácidos o azucares y usualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como también características de carga específicas. Algunos epitopes son epitopes lineales mientras que otros son epitopes conformacionales. Un epitope lineal es un epitope en donde una

secuencia primaria de aminoácidos contiguos comprende el epitope reconocido. Un epitope lineal típicamente incluye al menos 3, y más usualmente, al menos 5, por ejemplo, aproximadamente entre 8 y aproximadamente 10 aminoácidos contiguos. Un epitope conformacional puede resultar de al menos dos situaciones, tales como: a) una secuencia lineal que solamente se expone a unión con anticuerpo en ciertas conformaciones proteicas, por ejemplo, dependiendo de la unión de un ligando, o dependiendo de una modificación (por ejemplo, fosforilación) mediante moléculas señal; o b) una combinación de características estructurales de más de una parte de la proteína, o en proteínas con varias subunidades, de más de una subunidad, en donde las características están en proximidad suficiente en el espacio tridimensional para participar en la unión.

[050] Como se usa en la presente, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgGI) que está codificado por genes de región constante de cadena pesada.

[051] Como se usa en la presente, los términos "agente detectable," "rótulo" o "rotulado" se usan para designar la incorporación de un marcador detectable en un polipéptido o glicoproteína. En el arte se conocen y se pueden usar diferentes métodos de marcado de polipéptidos y glicoproteínas. Los ejemplos de rótulos para polipéptidos incluyen a, pero no como limitación, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, indio (^{111}In), iodo (^{131}I o ^{125}I), ytrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), bismuto (^{212}Bi o ^{213}Bi), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^{3}H), rodio (^{188}Rh), tecnecio (^{99}mTc), 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

iodo-121 (^{121}I)), rótulos fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánido fosforoso), rótulos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, beta-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotinilo (que se pueden detectar mediante una avidina marcada, por ejemplo, una molécula que contiene un grupo estreptavidina y un marcador fluorescente o una actividad enzimática que se puede detectar mediante métodos ópticos o colorimétricos), y epitopes polipeptídicos predeterminados que se reconocen mediante un reportero secundario (por ejemplo, secuencias pares de cierre de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios de unión a metales, marcas de epitope). En algunas formas de realización, se unen rótulos mediante brazos espaciadores de diferentes longitudes para reducir una potencial barrera estérica.

[052] Como se usa en la presente, "unión específica," "une(n) específicamente" o "especificidad de unión" significan, para una molécula de anticuerpo anti-GCC, que la molécula de anticuerpo se une a GCC, por ejemplo, proteína GCC humana, con mayor afinidad que lo que lo hace a una proteína no GCC, por ejemplo, BSA. Típicamente, una molécula anti-GCC tendrá una K_d por la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, que es mayor que 2, mayor que 10, mayor que 100, mayor que 1.000 veces, mayor que 10^4 , mayor que 10^5 , o mayor que 10^6 veces su K_d por GCC, por ejemplo, proteína GCC humana. En la determinación de K_d, la K_d por GCC y la proteína no GCC, por ejemplo, BSA, se debe hacer bajo las mismas condiciones.

[053] Como se usa en la presente, 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 la administración, por ejemplo, mediante

aplicación, a un tejido o célula aislada de un sujeto, que se retorna al sujeto. La molécula de anticuerpo anti-GCC se puede administrar sola o en combinación con un segundo agente. El tratamiento puede ser para curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, paliar, progresar o afectar el trastorno, los síntomas del trastorno o la predisposición hacia el trastorno, por ejemplo, un cáncer. Sin pretender estar ligado en la teoría, el tratamiento se cree que causa la inhibición, ablación, o muerte de una célula *in vitro* o *in vivo*, o de otro modo la reducción de la capacidad de una célula, por ejemplo, una célula aberrante, para mediar un desorden, por ejemplo, un trastorno como se describe en la presente (por ejemplo, un cáncer).

[054] Como se usa en la presente, el término "sujeto" tiene la intención de incluir a 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 donde 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 donde al menos algunas de las células expresan GCC. El término de la invención "animales no humanos" incluye a todos los vertebrados no humanos, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos no humanos, tales como primates no humanos, oveja, perro, vaca, pollos, anfibios, reptiles, etc., a menos que se especifique de otro modo. En una forma de realización, sujeto excluye a uno o más o a todos de un ratón, rata, conejo o cabra.

[055] Como se usa en la presente, 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, ante administración de dosis simple o múltiple a un sujeto, para tratar una célula, por ejemplo, célula cancerosa (por ejemplo, una célula tumoral que expresa GCC), o para prolongar el curado, alivio, recuperación o mejora de un sujeto con un trastorno como se describe en la presente más allá de lo que se espera en ausencia de dicho tratamiento. Como se usa en la presente, "inhibir el crecimiento" de un tumor o cáncer se refiere a disminuir, interrumpir, arrestar o detener su crecimiento y/o metástasis y no indica necesariamente una eliminación total del crecimiento tumoral.

[056] Como se usa en la presente, proteína "GCC," también conocida como "STAR", "GUC2C", "GUCY2C" o "receptor ST" se refiere a GCC de mamífero, preferentemente proteína GCC humana. GCC humana se refiere a la proteína que se muestra en SEQ ID NO:228 y variantes proteicas alélicas de las misma de origen natural. El alelo de SEQ ID NO: 228 puede estar codificado por la secuencia de ácidos nucleicos de GCC que se muestra en SEQ ID NO:227. Otras variantes son conocidas en el arte. Véase, por ejemplo, número de acceso Ensp0000261170, Ensembl Database, European Bioinformatics Institute and Wellcome Trust Sanger Institute, que tienen una leucina en el residuo 281; SEQ ID NO: 14 de la solicitud de patente de EE.UU. publicada número US 20060035852; o número de acceso a GenBank AAB19934. Típicamente, una variante alélica de origen natural tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95%, 97% o 99% idéntica a la secuencia

de GCC de SEQ ID NO:228. El transcripto codifica para un producto proteico de 1073 aminoácidos, y se describe en GenBank número de acceso: NM_004963. La proteína GCC se caracteriza como una proteína receptora de de superficie celular transmembrana, y se cree que tiene un rol crítico en el mantenimiento del fluido intestinal, la homeostasis de electrolitos y la proliferación celular.

[057] A menos que se especifique de otra manera, el término "alquilo" se refiere a un hidrocarburo saturado lineal o ramificado que tiene entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono posibles), con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 átomos de carbono siendo lo preferido. Los ejemplos de grupos alquilo son metilo, etilo, *n*-propilo, *iso*-propilo, *n*-butilo, *iso*-butilo, *sec*-butilo, *tert*-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.

[058] Los grupos alquilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, se pueden denominar como "sustituidos." Un grupo alquilo sustituido es un grupo alquilo que está sustituido con uno o más grupos, preferentemente entre 1 y 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional elegido de halógeno), incluyendo, pero no como limitación, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, .NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3 , -NH_2, -

NH(R'), -$N(R')_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo, y en donde dichos grupos -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, y -C_2-C_8 alquinilo pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más grupos incluyendo, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -$C(O)NH_2$, -C(O)NHR'', -$C(O)N(R'')_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -$S(O)_2$R'', -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -$N(R'')_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o –arilo.

[059] A menos que se especifique de otra manera, los términos "alquenilo" y "alquinilo" se refieren a cadenas carbonadas lineales o ramificadas que tienen entre aproximadamente 2 y aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono posibles), con entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 átomos de carbono siendo lo preferido. Una cadena de alquenilo 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 alquenilo incluyen a, pero no como limitación, etileno o vinilo, alilo, -1-butenilo, -2-butenilo, -isobutilenilo, -1-pentenilo, -2-pentenilo, -3-metil-1-butenilo, -2-metil-2-butenilo, y -2,3-dimetil-2-butenilo. Los ejemplos de grupos alquinilo incluyen a, pero no como limitación, acetilénico, propargilo, acetilenilo, propinilo, -1-butinilo, -2-butinilo, -1-pentinilo, -2-pentinilo, y -3-metil-1 butinilo.

[060] Como con los grupos alquilo, los grupos alquenilo y alquinilo, pueden estar sustituidos. Un grupo alquenilo o alquinilo "sustituido" es uno que está sustituido con uno o más grupos, preferentemente entre 1 y 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional elegido de halógeno), incluyendo pero no como limitación, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o –arilo, y en donde dichos grupos -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, y -C_2-C_8 alquinilo pueden estar además opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH_2, -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')$_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -S(O)$_2$R'', -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -N(R'')$_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo.

[061] A menos que se especifique de otra manera, el término "alquileno" se refiere a un radical hidrocarbonado de cadena saturada ramificada o lineal que tiene entre aproximadamente 1 y aproximadamente 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono posibles), con entre aproximadamente 1 y aproximadamente 8 átomos de carbono siendo lo preferido, y que tiene dos centros radicales monovalentes que se obtienen por

la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos átomos de carbono diferentes de un alqueno parental. Los alquilenos típicos incluyen, pero no como limitación, metileno, etileno, propileno, butileno, pentileno, hexileno, heptileno, ocitileno, nonileno, decaleno, 1,4-ciclohexileno, y similares. Los grupos alquileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más grupos, preferentemente entre 1 y 3 grupos (y cualquier sustituyente adicional elegido de halógeno), incluyendo a, pero no como limitación, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -$C(O)NH_2$, -C(O)NHR', -$C(O)N(R')_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -$S(O)_2R'$, -S(O)R', -OH, =O, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -$N(R')_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o –arilo y en donde dichos grupos -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, y -C_2-C_8 alquinilo además pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes incluyendo a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -$C(O)NH_2$, -C(O)NHR'', -$C(O)N(R'')_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -$S(O)_2R''$, -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -$N(R'')_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo.

[062] A menos que se especifique de otra manera, el término "alquenileno" se refiere a un grupo alquileno opcionalmente sustituido que contiene al menos un doble enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos

alquenileno incluyen a, por ejemplo, etenileno (-CH=CH-) y propenileno (-CH=CHCH$_2$-).

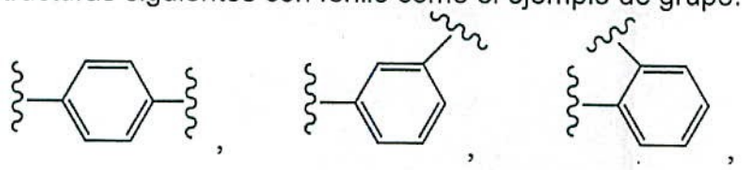
[063] A menos que se especifique de otra manera, el término "alquinileno" se refiere a un grupo alquilino opcionalmente sustituido que contiene al menos un triple enlace carbono-carbono. Los ejemplos de grupos alquinileno incluyen a, por ejemplo, acetileno (-C≡C-), propargilo (-CH$_2$C≡C-), y 4-pentinilo (-CH$_2$CH$_2$CH$_2$C≡CH-).

[064] A menos que se especifique de otra manera, el término "arilo" se refiere a un radical de hidrocarburo aromático monovalente de entre 6 y 20 átomos de carbono (y todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono posibles) que resultan de la eliminación de un átomo de hidrógeno de un átomo de carbono individual de un sistema anular aromático parental. Algunos grupos arilo están representados en los ejemplos de estructura como "Ar". Los grupos arilo típicos incluyen a, pero no como limitación, radicales derivados de benceno, benceno sustituido, fenilo, naftaleno, antraceno, bifenilo, y similares.

[065] Un grupo arilo, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más, preferentemente entre 1 y 5, o incluso entre 1 y 2 grupos incluyendo a, pero no como limitación, -halógeno, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH$_2$, -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO$_3$R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -NO$_2$, -N$_3$, -NH$_2$, -NH(R'), -N(R')$_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo y en donde dichos grupos -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo,

O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), y -arilo además pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')$_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -$S(O)_2$R'', -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -N(R'')$_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo.

[066] A menos que se especifique de otra manera, el término "arileno" se refiere a un grupo arilo opcionalmente sustituido que es divalente (o sea, se obtiene por la eliminación de dos átomos de hidrógeno a partir del mismo o de dos diferentes átomos de carbono de un sistema anular aromático parental) y que pueden estar en configuraciones orto, meta, o para como se muestra en las estructuras siguientes con fenilo como el ejemplo de grupo:



Los grupos típicos "-(C_1-C_8 alquilen)arilo," "-(C_2-C_8 alquenilen)arilo", y "-(C_2-C_8 alquinilen)arilo" incluyen a, pero no como limitación, bencilo, 2-fenilethan-1-ilo, 2-fenileten-1-ilo, naftilmetilo, 2-naftiletan-1-ilo, 2-naftileten-1-ilo, naftobencilo, 2-naftofeniletan-1-ilo y similares.

[067] A menos que se especifique de otra manera, el término "heterociclo," se refiere a un sistema anular monocíclico, bicíclico, o policíclico que tiene entre 3 y 14 átomos de anillo (también denominados como miembros de anillo) en donde al menos un átomo de anillo en al menos un anillo es un hereroátomo que se elige de N, O, P, o S (y todas las combinaciones y

subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono y heteroátomos posibles). El heterociclo puede tener entre 1 y 4 heteroátomos de anillo que se eligen independientemente de N, O, P, o S. Uno o más átomos de N, C, o S en un heterociclo pueden estar oxidados. Un heterociclo monocíclico preferentemente tiene entre 3 y 7 miembros de anillo (por ejemplo, entre 2 y 6 átomos de carbono y entre 1 y 3 heteroátomos que se eligen independientemente de N; O, P, o S), y un heterociclo bicíclico preferentemente tiene entre 5 y 10 miembros de anillo (por ejemplo, entre 4 y 9 átomos de carbono y entre 1 a 3 heteroátomos que se eligen independientemente de N, O, P, o S). El anillo que incluye al heteroátomo puede ser aromático o no aromático. A menos que se especifique de otra manera, el heterociclo se une a su grupo sostén por cualquier heteroátomo o átomo de carbono que resulte en una estructura estable.

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

[069] A menos que se especifique de otra manera, el término "heterociclo" se refiere a un grupo heterocíclico opcionalmente sustituido como se definió previamente que es divalente (o sea, que resulta de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos diferentes átomos de carbono de un sistema anular heterocíclico parental).

[070] Los ejemplos de grupos "heterocíclicos" incluyen a modo de ejemplo, y no como limitación, a 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, tetrahidrofuranilo, bis-tetrahidrofuranilo, tetrahidropiranilo, bis-tetrahidropiranilo, tetrahidroquinolinilo, tetrahidroisoquinolinilo, decahidroquinolinilo, octahidroisoquinolinilo, 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, indolizinilo, isoindolilo, 3H-indolilo, 1H-indazolilo, purinilo, 4H-quinolizinilo, ftalazinilo, naftiridinilo, quinoxalinilo, quinazolinilo, cinnolinilo, 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, bencisoxazolilo, oxindolilo, benzoxazolinilo, e isatinoilo. Los grupos "heterociclo" preferidos incluyen a, pero no como limitación, benzofuranilo, benzotiofenilo, indolilo, benzopirazolilo, cumarinilo, isoquinolinilo, pirrolilo, tiofenilo, furanilo, tiazolilo, imidazolilo, pirazolilo, triazolilo, quinolinilo, pirimidinilo, piridinilo, piridonilo, pirazinilo, piridazinilo, isotiazolilo, isoxazolilo y tetrazolilo.

[071] Un grupo heterocíclico, ya sea solo o como parte de otro grupo, puede estar opcionalmente sustituido con uno o más grupos, preferentemente entre 1 y 2 grupos, incluyendo a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8

alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo y en donde dichos grupos -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, y arilo además pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes incluyendo a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')$_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -S(O)$_2$R'', -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -N(R'')$_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o arilo.

[072] A modo de ejemplo y no como limitación, los heterociclos unidos a carbono pueden estar unidos a 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, tetrahidrofurano, 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 quinolina; o posición 1, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 de una isoquinolina. Aun más típicamente, los heterociclos unidos a carbono incluyen a 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.

[073] A modo de ejemplo y no como limitación, los heterociclos unidos a nitrógeno pueden estar unidos a 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-indazola; posición 2 de un isoindol, o isoindolina; posición 4 de una morfolina; y posición 9 de un carbazol, o β-carbolina. Aun más típicamente, los heterociclos unidos a nitrógeno incluyen a 1-aziridilo, 1-azetedilo, 1-pirrolilo, 1-imidazolilo, 1-pirazolilo, y 1-piperidinilo.

[074] A menos que se especifique de otra manera, el término "carbociclo," se refiere a un sistema anular saturado o sin saturar no aromático monocíclico, bicíclico, o policíclico que tiene entre 3 y 14 átomos de anillo (y todas las combinaciones y subcombinaciones de rangos y números específicos de átomos de carbono posibles) en donde todos los átomos de anillo son átomos de carbono. Los carbociclos monocíclicos preferentemente tienen entre 3 y 6 átomos de anillo, aun más preferentemente 5 o 6 átomos de anillo. Los carbocliclos bicíclicos preferentemente tienen entre 7 y 12 átomos de anillo, por ejemplo, arreglados como un sistema biccíclico [4,5], [5,5], [5,6] o [6,6], o 9 o 10 átomos de anillo arreglados como un sistema bicíclico [5,6] o [6,6]. El término "carbociclo" incluye, por ejemplo, un anillo carbocíclico monocíclico fusionado a un anillo arilo (por ejemplo, un anillo carbocíclico monocíclico fusionado a un anillo de benceno). Los carbociclos preferentemente tienen entre 3 y 8 átomos de carbono de anillo.

[075] Los grupos carbocíclicos, ya sea solos o como parte de otro grupo, pueden estar opcionalmente sustituidos con, por ejemplo, uno o más grupos, preferentemente 1 o 2 grupos (y cualquier sustituyente adicional elegido de halógeno), incluyendo a, pero no como limitación, -halógeno, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$, -NHC(O)R', -SR', -SO_3R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, =O, -N_3, -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ y -CN, en donde cada R' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo y en donde dichos grupos -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), y arilo además pueden estar opcionalmente sustituidos con uno o más sustituyentes que incluyen a, pero no como limitación, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -halógeno, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -arilo, -C(O)R'', -OC(O)R'', -C(O)OR'', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR'', -C(O)N(R'')$_2$, -NHC(O)R'', -SR'', -SO_3R'', -S(O)$_2$R'', -S(O)R'', -OH, -N_3 , -NH_2, -NH(R''), -N(R'')$_2$ y -CN, en donde cada R'' se elige independientemente de -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, o -arilo.

[076] Los ejemplos de sustituyentes carbocíclicos monocíclicos incluyen a -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.

[077] Un "carbociclo," ya sea usado solo o como parte de otro grupo, se refiere a un grupo carbocíclico opcionalmente sustituido como se definió previamente que es divalente (o sea, que resulta de la eliminación de dos átomos de hidrógeno del mismo o de dos diferentes átomos de carbono de un sistema anular carbocíclico parental).

[078] A menos que el contexto lo indique de otro modo, un guión (-) designa al punto de unión a la molécula sostenida. De este modo, el término "-(C_1-C_8 alquilen)arilo" o "-C_1-C_8 alquilen(arilo)" se refiere a un radical C_1-C_8 alquileno como se definió en la presente en donde el radical alquileno está unido a la molécula sostén parental por cualquiera de los átomos de carbono del radical alquileno y uno de los átomos de hidrógeno unido al átomo de carbono del radical alquileno se reemplaza por un radical arilo como se definió en la presente.

[079] Cuando un grupo particular está "sustituido", ese grupo puede tener uno o más sustituyentes, preferentemente entre uno y cinco sustituyentes, más preferentemente entre uno y tres sustituyentes, más preferentemente entre uno y dos sustituyentes, que se eligen independientemente de la lista de sustituyentes. El grupo puede, sin embargo, tener por lo general cualquier número de sustituyentes elegidos de halógeno. Los grupos que están sustituidos están así indicados.

[080] Se intenta que la definición de cualquier sustituyente o variable en una localización en particular en una molécula sea independiente de sus definiciones en cualquier lado de la molécula. Se comprende que los sustituyentes y los patrones de sustitución sobre los compuestos de esta invención se seleccionen por parte de una persona con experiencia en el arte

para proveer compuestos que sean químicamente estables y que se puedan sintetizar fácilmente mediante técnicas conocidas en el arte así como también mediante los métodos que se establecen en la presente.

[081] Grupos protectores, como se usa en la presente, se refiere a grupos que bloquean selectivamente, ya sea en forma temporaria o bien en forma permanente, un sitio reactivo en un compuesto multifuncional. Los grupos protectores de hidroxilo apropiados para usar en la presente invención son farmacéuticamente aceptables y pueden necesitar o no ser clivados desde el compuesto parental luego de la administración a un sujeto con el objetivo de que el compuesto sea activo. El clivado es a través de procesos metabólicos normales dentro del cuerpo. Los grupos protectores de hidroxilo son bien conocidos en el arte, véase, PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS de T. W. *Greene* and P. G. M. Wuts (John Wiley & sons, 3ra Edición) incorporado a la presente como referencia en su totalidad para todos los propósitos e incluye a, por ejemplo, éter (por ejemplo, éteres de alquilo y éteres de sililo incluyendo, por ejemplo, dialquilsililéter, trialquilsililéter, dialquilalcoxisililéter), grupos protectores de éster, carbonato, carbamatos, sulfonato, y fosfato. Los ejemplos de grupos protectores de hidroxilo incluyen a, pero no como limitación, éter metílico; éter metoximetílico, éter metiltiometílico, éter (fenildimetilsililo)metoximetílico, éter benciloximetílico, éter p-metoxibenciloximetílico, éter p-nitrobenciloximetílico, éter o-nitrobenciloximetílico, éter (4-metoxifenoxi)metílico, éter guaiacolmetílico, éter t-butoximetílico, éter 4-penteniloximetílico, éter siloximetílico, éter 2-metoxietoximetílico, éter 2,2,2-tricloroetoximetílico, éter bis(2-cloroetoxi)metílico, éter 2-(trimetilsililo)etoximetílico, éter mentoximetílico, éter

tetrahidropiranílico, éter 1-metoxiciclohexílico, éter 4-metoxitetrahidrotiopiranílico, 4-metoxitetrahidrotiopiranilo éter S,S-Dióxido, 1-[(2-cloro-4-metil)fenil]-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1-(2-fluorofneilo)-4-metoxipiperidin-4-il éter, 1,4-dioxan-2-il éter, tetrahidrofuranil éter, tetrahidrotiofuranil éter; éteres de etilo sustituidos tales como 1-etoxietil éter, 1-(2-cloroetoxi)etil éter, 1-[2-(trimetilsililo)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, éter alílico, éteres de propargilo, p-clorofenil éter, p-metoxifenil éter, éter bencílico, p-metoxibencil éter, 3,4-dimetoxibencil éter, trimetilsilil éter, trietilsilil éter, tripropilsilil éter, dimetilisopropilsilil éter, dietilisopropilsilil éter, dimetilhexilsilil éter, t-butildimetilsilil éter, difenilmetilsilil éter, éster de benzoilformato, 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 benzoate, alquil metil carbonato, alquil 9-fluorenilmetil carbonato, alquil etil carbonato, alquil 2,2,2,-tricloroetil carbonato, 1,1,-dimetil-2,2,2-tricloroetil carbonato, alquilsulfonato, metanesulfonato, bencilsulfonato, tosilato, metilen acetal, etiliden acetal, y t-butilmetiliden cetal. Los grupos protectores preferidos están representados 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 C_1-C_{20} alquilo, C_2-C_{20} alquenilo, C_2-C_{20} alquinilo, -C_1-C_{20} alquilen(carbociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(carbociclo), -C_2-C_{20} alquinilen(carbociclo), -C_6-C_{10} arilo, -C_1-C_{20} alquilen(arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(arilo), -C_2-C_{20} alquinilen(arilo), -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilene(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo) en donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo,

alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo, ya sea solos o como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

[082] La abreviatura "AFP" se refiere a dimetilvalina-valina-dolaisoleuina- dolaproina-fenilalanina-p-fenilenediamina (véase la Fórmula (*XVIII*) *infra*).

[083] La abreviatura "MMAE" se refiere a monometil auristatina E (véase la Fórmula (*XIII*) *infra*).

[084] La abreviatura "AEB" se refiere a un éster producido por reacción de auristatina E con ácido paraacetilbenzoico (véase la Fórmula (*XXII*) *infra*).

[085] La abreviatura "AEVB" se refiere a un éster producido por reacción de auristatina E con acido benzoilvalérico (véase la Fórmula (*XXIII*) *infra*).

[086] .La abreviatura "MMAF" se refiere a monometil auristatina F (véase la Fórmula (*XXI*) *infra*)

Anticuerpos

[087] En determinados aspectos, la invención se relaciona con moléculas de anticuerpo anti-GCC que presenta las características tales como las que se resumen en las Tablas 1 y 2. En otros aspectos, la invención se relaciona con moléculas de anticuerpo anti-GCC que presenta las características tales como las que se resumen en las Tablas 3, 4, 5 y/o 6.

[088] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo de hibridoma humano y es uno de los anticuerpos 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 y 1D3. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC deriva del anticuerpo 5F9, 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 o 1D3. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es

producida por el hibridoma 5F9 (PTA-8132).

[089] En una forma de realización la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo de linfocitos seleccionado y es uno de los anticuerpos Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338 y Abx-393. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC deriva del anticuerpo Abx-12, Abx-020, Abx-106, Abx-198, Abx-221, Abx-229, Abx-338 y Abx-393.

[090] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo de murino y es uno de los anticuerpos mAb 3G1, mAb 8E12, mAb10B8 y mAb 8F1. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC deriva del anticuerpo mAb 3G1, mAb 8E12 y mAb 8F1.

[091] En una forma de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC tendrá una afinidad por la GCC medida, por ejemplo, por unión directa o con ensayos de unión de competencia, en el rango que se describe en la presente. En una forma de 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 forma de realización, la molécula de anticuerpo es una IgG, o un fragmento de unión al antígeno del mismo, 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 forma de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo 5F9 o un anticuerpo derivado del mismo, tiene una K_d de entre aproximadamente 80 y aproximadamente 200 pM, preferentemente entre aproximadamente 100 y aproximadamente 150 pM o aproximadamente 120 pM. En una forma de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo

5F9, o un anticuerpo derivado del mismo, tiene una k_a de entre aproximadamente 0,9 y aproximadamente 1,25 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$, preferentemente es de aproximadamente 1,1 x 10^5 $M^{-1}s^{-1}$. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo es un ScFv y tiene una K_d menor que 1 x 10^{-6} M, menor que 1 x 10^{-7} M, menor que 1 x 10^{-8} M, menor que 1 x 10^{-9} M, menor que 1 x 10^{-10} M, menor que 1 x 10^{-11} M, menor que 1 x 10^{-12} M o menor que 1x10^{-13} M.

[092] En formas de realización, las moléculas de anticuerpo no son inmunoconjugados, es decir, son "desnudas" y en formas de realización causan una reacción celular cuando se unen a la GCC. En formas de realización relacionadas, la reacción celular es realizada por la célula que expresa GCC a la cual se une el anticuerpo. Dicha reacción celular puede se una transducción de señales mediada por GCC, por ejemplo, si la molécula de anticuerpo es un agonista de GCC (véase, por ejemplo, la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº. US20040258687. En otras formas de realización, la reacción celular es realizada por una segunda célula, por ejemplo, una célula inmune efectora (por ejemplo, una célula asesina natural) que reconoce la molécula de anticuerpo unida a GCC sobre la primera célula. En algunas formas de realización, hay moléculas supervisoras, por ejemplo, moléculas de complemento, que se ponen en contacto con la molécula de anticuerpo unida a GCC antes de la reacción celular. En estas formas de realización, las reacciones celulares pueden causar la muerte de la célula que expresa GCC.

[093] En formas de realización adicionales, las moléculas de anticuerpo que son inmunoconjugados pueden causar una reacción celular con su unión a la GCC y se pueden internalizar para administrar un agente en la célula que expresa GCC a la cual se une.

[094] En algunas formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede bloquear la unión del ligando a la GCC.

[095] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC no presenta una reacción cruzada sustancial con una o ambas GCC de rata y GCC de ratón.

[096] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo no es GCC:B10, GCC:4D7 o GCC:C8. En otra forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC no se une a un dominio intracelular de GCC, entre los residuos de aminoácidos 455 y 1073 aproximadamente de la SEQ ID N°: 228. Por ejemplo, en esta forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC no se une al dominio de homología con quinasa o al dominio guanililo ciclasa de GCC.

[097] La unidad estructural del anticuerpo de mamífero natural está tipificada por un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas de polipéptidos, donde cada par tiene una cadena "liviana" (de 25 kDa aproximadamente) y una cadena "pesada" (de 50-70 kDa aproximadamente). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos que primariamente son responsables del reconocimiento del antígeno. La porción carboxilo-terminal de cada cadena define una región constante primariamente responsable de la función efectora. Las cadenas livianas humanas se pueden clasificar como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se pueden clasificar como cadenas mu, delta, gamma, alfa o épsilon, y definen a los isotipos del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas

por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, donde la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 10 aminoácidos más. Véase, en general, *Fundamental Immunology*, Capítulo 7 (Paul, W., ed., 2a. ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Las regiones variables de cada par de cadenas liviana/pesada forman el sitio de unión al anticuerpo. Los isotipos preferidos para las moléculas de anticuerpo anti-GCC son las inmunoglobulinas IgG, que se pueden clasificar en cuatro subclases, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, que tienen diferentes cadenas pesadas gamma. La mayoría de los anticuerpos terapéuticos son anticuerpos humanos, quiméricos o humanizados del tipo IgG1. En una forma de realización particular, la molécula de anticuerpo anti-GCC tiene el isotipo IgG1.

[098] Las regiones variables de cada par de cadenas pesada y liviana forman el sitio de unión al antígeno. Por consiguiente, 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 cadenas pesada/liviana diferentes, lo que da como resultado dos sitios de unión diferentes.

[099] Todas las cadenas exhiben la misma estructura general de regiones de marco de trabajo (FR) relativamente conservadas unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad o CDR. Las CDR de las dos cadenas de cada par se alinean por las regiones de marco de trabajo, lo que permite la unión a un epitope específico. Entre los extremos N-terminal y C-terminal, ambas cadenas livianas y pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio se efectúa de

acuerdo con las definiciones de las Secuencias de Proteínas de Interés Inmunológico de Kabat (*National Institutes of Health*, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o de Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989). Según se usa en la presente, las CDR se refieren a cada una de las cadenas pesada (HCDR1, HCDR2, HCDR3) y liviana (LCDR1, LCDR2, LCDR3).

[0100] Una molécula de anticuerpo anti-GCC puede comprender todas, o un subconjunto de unión al antígeno, las CDR, de una o ambas, cadenas pesadas y livianas, de uno de los anticuerpos de hibridomas humanos, anticuerpos de linfocitos seleccionados o anticuerpos de murinos a los que se hizo referencia previamente. Las secuencias de aminoácidos de hibridomas humanos, linfocitos seleccionados y porciones de anticuerpos de murino, incluyendo las regiones variables y las CDR, se pueden consultar en la Tabla 3 y en la Tabla 5.

[0101] Por consiguiente, en una forma de realización la molécula de anticuerpo incluye una o ambas de:

(a) uno, dos, tres, o un número de unión al antígeno de, las CDR de la cadena liviana (LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3) de uno entre un hibridoma human, un linfocito seleccionado o anticuerpos de murinos mencionados previamente. En formas de realización, la(s) CDR(s) puede(n) comprender una secuencia de aminoácidos de una o más o todas las LCDR1-3 según se indica a continuación: LCDR1, o una LCDR1 modificada en donde uno a siete aminoácidos están sustituidos de manera conservadora); LCDR2, o una LCDR2 modificada en donde uno a dos aminoácidos están sustituidos de manera conservadora); o

LCDR3, o una LCDR3 modificada en donde uno a dos aminoácidos están sustituidos de manera conservadora; y

(b) uno, dos, tres, o un número de unión al antígeno de, las CDR de la cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3) de uno entre un hibridoma human, un linfocito seleccionado o anticuerpos de murinos mencionados previamente. En formas de realización, la(s) CDR(s) puede(n) comprender una secuencia de aminoácidos de una o más o todas las HCDR1-3 según se indica a continuación: HCDR1, o una HCDR1 modificada en donde uno o dos aminoácidos están sustituidos de manera conservadora); HCDR2, o una HCDR2 modificada en donde uno a cuatro aminoácidos están sustituidos de manera conservadora); o HCDR3, o una HCDR3 modificada en donde uno a dos aminoácidos están sustituidos de manera conservadora.

[0102] Los inmunógenos que son de utilidad para la producción de anticuerpos anti-GCC incluyen GCC por ejemplo, células que expresan la GCC humana (por ejemplo, una línea de células tumorales, por ejemplo, células T84, o células de tumor de colon frescas o congeladas, células recombinantes que expresan GCC); fracciones de membrana de células que expresan GCC (por ejemplo, una línea de células de tumor de colon, por ejemplo, células T84, o células tumorales colónicas frescas o congeladas, células recombinantes que expresan GCC, por ejemplo, células HT-29-GCC N° 2, que expresan la GCC de longitud completa, o una porción de la misma, por ejemplo, células CHO GCC N° 27 que expresan una porción que comprende el dominio extracelular de GCC, por ejemplo, la SEQ ID N°: 318); GCC aislada o purificada, por ejemplo, la proteína GCC humana (por ejemplo, una GCC aislada

bioquímicamente, por ejemplo, aislada de células de tumores 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 con quinasa de GCC o el dominio guanililo ciclasa catalítico de GCC o el péptido correspondiente a una porción de la misma, por ejemplo, que comprende al menos 8, 10, 12, 14, 16, 20, 24, 28 ó 32 residuos de aminoácidos aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228); o un inmunóg eno que comprende la SEQ ID Nº: 229 o que comprende una porción madura d el mismo sin la secuencia señal (es decir, sin los residuos de aminoácidos 1 a 21 ó 23 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 229), por ejemplo, la proteína madura TOK107-hIgG, SEQ ID Nº: 317.

[0103] Los inmunógenos se pueden fusionar a secuencias heterólogas para ayudar en la manipulación bioquímica, purificación, inmunización o medición de los títulos de anticuerpo. Dichos inmunógenos pueden comprender una porción de GCC, por ejemplo, el dominio extracelular, y una porción que comprende polipéptido que no sea de la GCC. Existen muchas opciones de construcción de proteínas de fusión que facilitan la purificación o inmovilización sobre un soporte sólido, por ejemplo, una columna de afinidad o una placa para microtitulación u otro sustrato/chip de ensayo adecuado. Por ejemplo, un grupo fusión puede agregar un dominio, por ejemplo, glutatión-S-transferasa/quinasa (GST), que se puede unir a glutatión; una región Fc de una inmunoglobulina, que se puede unir a una proteína A o a una proteína G; un residuos de aminoácidos, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, preferentemente seis residuos de histidina que se pueden unir a níquel o cobalto sobre una columna de afinidad; una marca de epitope, por ejemplo, una porción del

oncogen c-myc (marca myc), una marca FLAG (Patente de los EE.UU. Nº. 4.703.004), una marca de hemaglutinina (HA), una marca 10 del gen T7, una marca V5, una marca HSV o una marca VSV-G que se puede unir a un anticuerpo específico de la marca; o un cofactor, por ejemplo, biotina, que se puede unir a estreptavidina.

[0104] Los inmunógenos que comprenden la porción Fc de una inmunoglobulina pueden retener la GCC, ya sea en solución o unida a una célula, en una configuración que permita un acceso estructural a los epitopes GCC por los componentes supervisores inmunes del huésped para una generación eficiente de anticuerpos. Dado que las cadenas pesadas de inmunoglobulina que comprenden las regiones Fc se asocian en dímeros a través de enlaces disulfuro entre cadenas, 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 contribuya con una región Fc. Por ejemplo, las fusiones con las proteínas IgG pueden ser dímeros, las fusiones de IgA pueden formar inmunógenos tetraméricos y las fusiones de IgM pueden formar inmunógenos decaméricos, siendo las dos últimas facilitadas con la co-transfección de la cadena J. Un ejemplo de inmunoglobulina para una proteína de fusión Fc es IgG1. La porción que se emplea típicamente tiene la bisagra IgG1, los dominios CH2 y CH3 codificados por un solo exón. Dado que este exón también tiene una porción de la región CH1, que contiene una cisteína orientada a un enlace disulfuro con una cisteína de la cadena liviana, una modificación útil comprende mutar la cisteína de CH1, por ejemplo, por una serina, para asegurar que no haya cisteínas no apareadas en la proteína de fusión. Dicha mutación también incrementa la flexibilidad de la bisagra.

[0105] Una porción Fc derivada de una especie distinta del huésped, por ejemplo, una región Ig Fc humana, para su fusión a un inmunógeno para la inmunización en una especie huésped, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, actúa como adyuvante. Esta función de adyuvante puede desencadenar anticuerpos específicos contra ambos epitopes Fc y GCC. Los anticuerpos reactivos con Fc se pueden identificar y descartar durante la selección. La porción Fc puede contener una secuencia de tipo salvaje o una secuencia que es mutada para modificar la función efectora. Por ejemplo, se puede incorporar una región constante mutada (variante) en una proteína de fusión para minimizar la unión a los receptores Fc y/o la capacidad para fijar el complemento. (véase por ejemplo Winter et al., GB 2.209.757 B; Morrison et al., WO 89/07142; Morgan et al., WO 94/29351). En un ejemplo preferido, se muta la lisina 235 y la glicina 237, numeradas de acuerdo con estándares de la región Fc, por ejemplo, por alanina. Un inmunógeno/proteína de fusión con una IgG mutada con Fc puede tener una interacción reducida con los receptores Fc en el huésped. Un inmunógeno/proteína de fusión soluble preferido (después de la maduración para clivar el péptido señal y secreción) es TOK-107-hIgG (nombre alternativo hGCC-ECD/hIgG1 Fc), que consiste de los residuos de aminoácidos 24 a 430 de la SEQ ID Nº: 228 fusionado a la Fc de la inmuno globulina IgG1 humana mutada (SEQ ID Nº: 317).

[0106] Para preparar un inmunógeno expresado en células, se puede estructurar la porción de inmunoglobulina para imitar una porción de inmunoglobulina del receptor de la célula B. Por ejemplo, la región Fc de la inmunoglobulina también se puede fusionar a un polipéptido que comprende una región transmembrana de un receptor inmune, tales como receptores Fcγ,

receptores Fcα, el receptor Fcα/μ o receptores Fcε. Es posible mejorar la orientación apropiada de dicho inmunógeno unido a células con un receptor Fc con una exposición adecuada sobre la superficie celular si la célula que expresa al inmunógeno/proteína de fusión además comprende componentes adicionales del complejo de antígeno receptor, por ejemplo, del receptor IgM o del receptor IgD de la célula B. Los componentes adecuados del complejo incluyen proteínas asociadas a la inmunoglobulina (Ig), tales como MB-1 y B29 (CD79A y CD79B; Hombach et al. *Eur. J. Immunol.* 20: 2795-2799 (1990) para el receptor IgM), que forma un heterodímero. La célula transfectada puede proveer las proteínas asociadas a la Ig endógenamente, por ejemplo, si se transfecta una línea celular de linfoma de células B; o por co-transfección del inmunógeno con proteínas asociadas, por ejemplo, en un vector separado o en el mismo vector. Las proteínas asociadas a IgG preferidas para una inmunización en ratón son las proteínas CD79a y CD79b ratón (GenBank, N° Acceso NM_007655 y NM_008339, respectivamente). Una proteína de fusión inmunógena unida a células preferida (después de la maduración para clivar el péptido señal y la traslocación a la superficie celular) es el producto TOK111, que consiste de TOK-107hIgG (hGCC-ECD/hIgG1 Fc) fusionada a la transmembrana y dominios intracelulares (SEQ ID N°. 318) de la IgG2a de ratón (por ejemplo, GenPept, N°Acceso AAB59661).

[0107] Los epitopes útiles, por ejemplo, los epitopes de referencia, de la molécula de GCC, a los cuales se unen las moléculas de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos o anticuerpos humanizados, que se describen en la presente, se pueden encontrar sobre la porción extracelular de GCC. Dichos epitopes de GCC se pueden unir a las

moléculas de anticuerpo sobre la superficie de células, por ejemplo, sobre el exterior de la célula.

[0108] Por ejemplo, un epitope para una molécula de anticuerpo anti-GCC puede residir dentro o puede incluir uno o más residuos de los residuos 1-50 de la SEQ ID Nº: 228, o un fragmento de la misma que se une a una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, un fragmento de unión a 5F9 de la misma. Dichos fragmentos pueden comprender los residuos 1-25, 5-30, 10-35, 15-40, 20-45, 25-50, 5-45, 10-40, 15-35, 20-30 ó 33-50 de la SEQ ID Nº: 228. En algunas formas de realización, un epitope para una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo 5F9, es un epitope de conformación que además comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales en la secuencia de aminoácidos de GCC más allá del residuo 50, es decir, se puede seleccionar del residuo 50 al 1073 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228.

[0109] Por ejemplo, un epitope para una molécula de anticuerpo anti-GCC puede residir dentro o puede incluir uno o más residuos de la SEQ ID Nº: 225, o los residuos 271-300 de la SEQ ID Nº: 228 o un fragmento de la misma que se une a una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, un fragmento de unión a ABX-198, 3G1, 8F1 o 10B8 de la misma. Dichos fragmentos pueden comprender los residuos 281-290 de la SEQ ID Nº: 228 o los residuos 281-290 de la SEQ ID Nº: 228, en donde el residuo 281 es leucina, o los residuos 281-300 o los residuos 271-290 de la SEQ ID Nº: 228. En algunas formas de realización, el epitope para una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo ABX-198, 3G1, 8F1 o 10B8, es un epitope de conformación que además comprende uno o más residuos de

aminoácidos adicionales, es decir, residuos que no son de la SEQ ID Nº: 225 en la secuencia de aminoácidos de GCC, por ejemplo, seleccionado entre el residuo 1 y 270 aproximadamente y/o entre 301 y 1073 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228.

[0110] En otro ejemplo, un epitope para la molécula de anticuerpo anti-GCC puede residir dentro o puede incluir uno o más residuos de la SEQ ID Nº: 226, o los residuos 351-375 de la SEQ ID Nº: 228 o un fragmento de la misma que se une a una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, un fragmento de unión a ABX-012, ABX-338 o ABX-106 de la misma. Dichos fragmentos pueden comprender los residuos 356-370 de la SEQ ID Nº: 228 o los residuos 351-370 de la SEQ ID Nº: 228 o los residuos 355-375 de la SEQ ID Nº: 228. En algunas formas de realización, el epitope para una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un anticuerpo ABX-012, ABX-338 o ABX-106, es un epitope de conformación que además comprende uno o más residuos de aminoácidos adicionales, es decir, residuos que no son de la SEQ ID Nº: 226 en la secuencia de aminoácidos de GCC, por ejemplo, seleccionado entre el residuo 1 y 350 aproximadamente y/o entre 376 y 1073 aproximadamente de la SEQ ID Nº: 228.

[0111] Los anticuerpos generados contra dichos epitopes o el dominio extracelular, por ejemplo, epitopes que residen dentro o que incluyen uno o más residuos entre el residuo de aminoácido 24 y 420 de la SEQ ID Nº: 228, o una porción de referencia de la misma, por ejemplo, entre los residuos 24 y 75, entre 75 y 150, entre 150 y 225, entre 225 y 300, entre 300 y 375 o entre 375 y 420 de GCC, o moléculas de anticuerpo derivadas de los mismos, pueden ser de utilidad como anticuerpos terapéuticos o de diagnóstico, como se describe

en la presente.

[0112] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC presenta una o más de las siguientes propiedades:

a) compite por la unión, por ejemplo, la unión a la GCC de la superficie celular o a una GCC purificada, con una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC a las cuales se hizo referencia previamente y que se resumen en las Tablas 1 y 2 por ejemplo, anticuerpos de hibridomas humanos (por ejemplo, 5F9), anticuerpos de linfocitos seleccionados (por ejemplo, Abx-229) o anticuerpos de murinos (por ejemplo, 3G1);

b) se une al mismo, o sustancialmente el mismo, epitope sobre GCC que una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC a las cuales se hizo referencia previamente y que se resumen en las Tablas 1 y 2, por ejemplo, anticuerpos de hibridomas humanos (por ejemplo, 5F9), anticuerpos de linfocitos seleccionados (por ejemplo, Abx-229) o anticuerpos de murinos (por ejemplo, 3G1). En una forma de realización, el anticuerpo se une al mismo epitope, determinado en uno o más en un ensayo de ordenamientos de péptidos o por unión a mutantes de truncamiento, quimeras o mutantes puntuales expresados sobre la superficie celular o preparaciones de membrana, por ejemplo, como los ensayos que se describen en la presente;

c) se une a un epitope que tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 15 ó 20 residuos de aminoácidos contiguos en común con el epitope de una de las moléculas de anticuerpo anti-GCC a las cuales se hizo referencia previamente y que se resumen en las Tablas 1 y 2, por ejemplo, anticuerpos de hibridomas humanos (por ejemplo, 5F9), anticuerpos de

linfocitos seleccionados (por ejemplo, Abx-229) o anticuerpos de murinos (por ejemplo, 3G1);

d) se une a una región de la GCC humana que se une a un anticuerpo anti-GCC de la invención, en donde la región, por ejemplo una región extracelular o citoplasmática, es de 10-15, 10-20, 20-30 ó 20-40 residuos de longitud, y la unión se determina, por ejemplo, por unión a mutantes de truncamiento. En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la región extracelular de la GCC humana. En una forma de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC se puede unir a la porción del dominio extracelular de la GCC humana definida por los residuos de aminoácidos 24 a 420 de la SEQ ID Nº: 228. En una forma de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC se puede unir al sitio de signatura de la guanilato ciclasa en los residuos de aminoácidos 931 a 954 de la SEQ ID Nº: 228; o

e) se une a un epitope de referencia descrito en la presente.

[0113] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la secuencia de GCC, ILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLS (SEQ ID Nº: 225).

[0114] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC se une a la secuencia de GCC, FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID Nº: 226).

[0115] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo se une a un epitope de conformación. En otras formas de realización, una molécula de anticuerpo se une a un epitope lineal.

[0116] Las moléculas de anticuerpo anti-GCC pueden ser anticuerpos

policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos monoespecíficos, anticuerpos quiméricos (Véase la Patente de los EE.UU. Nº. 6.020.153) o anticuerpos humanos o humanizados o fragmentos de anticuerpo o derivados de los mismos. La presente invención también contempla variantes de síntesis y manipulados genéticamente (Véase la Patente de los EE.UU. Nº. 6.331.415) de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos monoclonales se pueden producir mediante una variedad de técnicas, incluyendo por ejemplo una metodología convencional de anticuerpos monoclonales de murinos, la técnica de hibridación células somáticas estándar 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.

[0117] La inmunización con proteínas, por ejemplo, GCC o una porción soluble, o una proteína de fusión que comprende una porción de GCC (por ejemplo, TOK107-hIg) o células o fracciones de membrana de la misma, por ejemplo, células que expresan GCC expuesta sobre la superficie o una porción de la misma (por ejemplo, el producto pLKTOK4 o el producto pLKTOK111), se puede realizar con el inmunógeno preparado para inyecciones de una manera que inducirá una respuesta, por ejemplo, con un adyuvante, por ejemplo, el adyuvante completo de Freund. Otros adyuvantes adecuados incluyen el adyuvante TITERMAX GOLD® (CYTRX Corporation, Los Angeles, CA) y alumbre. Se pueden ligar inmunógenos de péptidos pequeños a una molécula más grande, tal como hemocianina de lapa. A los ratones se los puede inyectar de numerosas maneras, por ejemplo, subcutánea, intravenosa o intramuscular en numerosos sitios, por ejemplo, en el peritoneo (i.p.), en la

base de la cola o en la almohadilla plantar o en una combinación de sitios, por ejemplo, IP y en la base de la cola (BIP). Las inyecciones de refuerzo pueden incluir el mismo inmunógeno o uno diferente y además pueden incluir un adyuvante, por ejemplo, en adyuvante incompleto de Freund. La inmunización con ADN, por ejemplo, con el 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-hIg) se puede efectuar por inyección usando la tecnología de pistola de genes. Por ejemplo, el ADN se carga sobre partículas de oro microscópicas y se inyectó a los ratones a intervalos frecuentes sobre un período breve.

[0118] 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 heteromieloma) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se pueden obtener de sangre periférica o, preferentemente de bazo o nódulos linfáticos, de humanos, de animales transgénicos con 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) se puede producir usando métodos adecuados, por ejemplo, fusión de una célula productora anticuerpos humanos y un heteromieloma o trioma, o inmortalización de una célula B humana activada por infección con el virus de Epstein Barr. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. Nº. 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).)

Las células productoras de anticuerpos fusionadas o inmortalizadas (hibridomas) se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas y clonar por dilución limitante. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden identificar usando un ensayo adecuado (por ejemplo, un ELISA (por ejemplo, con un inmunógeno, por ejemplo, TOK107-hIgG, inmovilizado sobre la cavidad de microtitulación) o por 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 GCC comprende una porción de fusión que es un reactivo de afinidad, esta porción puede permitir que la proteína de fusión que comprende GCC, o una porción de la misma, se una a una matriz, por ejemplo, placas para microtitulación o chips de ensayo recubiertos con proteína G, recubiertos con estreptavidina, derivatizados con glutatión o recubiertos con anticuerpo, que luego se combinan con el suero inmune o el medio condicionado de un hibridoma o de una célula recombinante que expresa anticuerpos, y luego incubar la mezcla bajo condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, a condiciones fisiológicas de sales y pH). Después de la incubación, las cavidades de la placa para microtitulación o las celdas del chip se lavan para remover cualquier componente no unido y luego se mide la unión por anticuerpo anti-GCC.

[0119] En formas de realización, 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 disminuyen o eliminan la inmunogenicidad del anticuerpo en un huésped receptor, permitiendo así un incremento en la biodisponibilidad y una reducción

en la posibilidad de una reacción inmune adversa, permitiendo así potencialmente múltiples administraciones de anticuerpos.

[0120] Los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos humanizados, quiméricos o con injertos de CDR. Las respuestas de anticuerpos anti-ratón humanos (HAMA) han conducido al desarrollo de anticuerpos quiméricos o humanizados de otra manera. Si bien los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable de murinos, se espera observar determinadas respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA), en particular en los usos crónicos o de múltiples dosis del anticuerpo. La presencia de dichas proteínas derivadas de murinos o de ratas puede conducir a una depuración rápida de los anticuerpos o puede conducir a la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo en un paciente. Con el fin de evitar el uso de anticuerpos derivados de murinos o de ratas, se han desarrollado los anticuerpos humanizados en los cuales se introducen secuencias en la secuencia del anticuerpo para hacerla más semejante a la secuencia del anticuerpo humano, o anticuerpos completamente humanos generados por la introducción de la función del anticuerpo humano en un roedor de modo que el roedor produciría anticuerpos que contienen secuencias completamente humanas. Los anticuerpos humanos evitan determinados problemas asociados con los anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes de murinos, de conejos o de ratas.

Anticuerpos humanos

[0121] Las moléculas de anticuerpo completamente humanas pueden minimizar las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a los mAbs de ratón o derivatizados de ratón y así incrementar la eficacia y seguridad de los

anticuerpos administrados. El uso de moléculas de anticuerpo completamente humanas puede proveer una ventaja sustancial en el tratamiento de enfermedades crónicas y recurrentes en humanos, tales como inflamación, autoinmunidad y cáncer, que requieren de administraciones repetidas de anticuerpo. Además, las moléculas de anticuerpo humanas se pueden producir usando cepas de animales manipuladas genéticamente en las cuales se ha suprimido la expresión del gen del anticuerpo del animal y se ha reemplazado funcionalmente por la expresión del gen de la molécula del anticuerpo humano.

[0122] Los métodos para elaborar anticuerpos humanos son conocidos en el arte. Un método para elaborar 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 sufrir un reordenamiento funcional, que fue insertado es su propio genoma y la producción endógena de anticuerpos del propio animal se vuelve deficiente en la producción de anticuerpos. Los métodos para elaborar dichos animales transgénicos son conocidos en el arte. Dichos animales transgénicos se pueden obtener usando la tecnología XENOMOUSE™ o usando un enfoque de "minilocus". Los métodos para elaborar XENOMICE™ se describen en las Patentes de los EE.UU. Nº. 6.162.963, 6.150.584, 6. 114.598 y 6.075.181, que se incorporan en la presente a modo de referencia. Los métodos para elaborar animales transgénicos usando el enfoque del "minilocus" se describen en las Patentes de los EE.UU. Nº. 5.545.807, 5.545.806 y 5 .625.825; véase también la publicación Internacional Nº. WO93/12227, cada una de las cuales se incorpora en la presente a modo de referencia. Otros ratones transgénicos

productores de anticuerpos humanos incluyen HUMAB-MOUSE®, ratones con transcromosoma KIRIN TC MOUSE™, KM-MOUSE® (MEDAREX, Princeton, NJ).

[0123] Con el uso de la tecnología de animales transgénicos con anticuerpos humanos, por ejemplo, la tecnología XENOMOUSE™, se pueden obtener anticuerpos humanos por inmunización de un ratón XENOMOUSE™ (Abgenix, Fremont, Calif.) con un antígeno de interés. Las células linfáticas (tales como células B) se recuperan (por ejemplo, se aíslan del tejido del bazo) de los ratones que expresan los anticuerpos. Estas células recuperadas se pueden fusionar con una línea celular de tipo mieloide para preparar líneas celulares de hibridomas inmortales, usando una metodología estándar. Estas líneas celulares de hibridomas se examinan y seleccionan para identificar líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos específicos para el antígeno de interés.

[0124] Los animales transgénicos con anticuerpos humanos proveen una fuente de ácidos nucleicos que puede ser enriquecida en ácidos nucleicos que codifican anticuerpos con las propiedades deseadas, tales como especificidad y afinidad. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o regiones variables de anticuerpos se pueden aislar de ratones transgénicos con anticuerpos humanos que fueron inmunizados con una proteína GCC o una variante o una porción de la misma. Los ácidos nucleicos aislados o porciones de los mismos (por ejemplo, porciones que codifican regiones variables, CDR, regiones de marco de trabajo) se pueden expresar usando cualquier método adecuado (por ejemplo, expresión en fagos) para producir una biblioteca de anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos (por ejemplo,

fragmentos de unión al antígeno de cadena simple, fragmentos de unión al antígeno de cadena doble) que está enriquecida en anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que se unen a una proteína GCC. Dicha biblioteca puede exhibir una mayor diversidad (por ejemplo, una diversidad combinatoria por apareamiento de las regiones variables de la cadena pesada y regiones variables de la cadena liviana) con relación al repertorio de anticuerpos producido en el animal transgénico con anticuerpos humanos inmunizado. La biblioteca se puede examinar usando cualquier ensayo adecuado (por ejemplo, un ensayo de unión con la proteína GCC) para identificar anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno con las propiedades deseadas (por ejemplo, especificidad, afinidad). Los ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno que tienen las propiedades deseadas se pueden recuperar usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. Nº. 5.871.907 (Winter *et al.*) y la Patente de los EE.UU. Nº. 6.057.098 (Buechler et al.).)

[0125] Como alternativa, los anticuerpos se pueden expresar en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridomas. Más específicamente, se pueden clonar las secuencias que codifican anticuerpos particulares de las células productoras de los anticuerpos y se pueden usar para la transformación de una célula huésped de mamífero adecuada. En un método preferido, se aíslan linfocitos del bazo y/o de nódulo linfático de ratones inmunizados de los ratones y se plaquean en ensayos en placa como fue descrito con anterioridad en Babcook et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93: 7843-8 (1996), que se incorpora en la presente a modo de referencia. Brevemente, se plaquean células en agar con glóbulos rojos de oveja, recubiertos con antígeno de GCC y

las células que secretan mAb contra el antígeno de GCC fijarían el complemento y lisarían los glóbulos rojos que rodean inmediatamente las células productoras de mAb. Las células dentro de las placas limpias se recuperan para secuenciar las secuencias de inmunoglobulinas y se subclonan en vectores de expresión. Los sobrenadantes de las células transfectadas transitoriamente que contienen mAb específicos para GCC son examinados a continuación por un ELISA y por su unión a las células por citometría de flujo. Las secuencias variables, o una porción de las mismas, de los anticuerpos humanos producidos que comprenden las CDR que se unen a epitopes particulares se pueden utilizar para la producción de anticuerpos modificados. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos producidos se pueden procesar en un casete de expresión para facilitar la transferencia de construcciones, una mayor expresión de las construcciones y/o la incorporación de las construcciones en vectores capaces de expresar de anticuerpos de longitud completa, véase, por ejemplo, US20060147445. En una forma de realización particular, el casete de expresión comprende la región constante de la cadena pesada del isotipo IgG1.

[0126] También se puede usar el método con anticuerpos de linfocitos seleccionados (SLAM, véase la Patente de los EE.UU. Nº. 5.627.052, Babcook et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 7843-7848 (1996)) para identificar las células que puedan proveer el anticuerpo de interés. En el SLAM, las células B se cultivan directamente, evitando así la tecnología de hibridomas, que típicamente captura tan solo un pequeño porcentaje de los anticuerpos generados originalmente por el ratón. Con el uso de ensayos basados en microplacas, las células B son evaluadas rápidamente sobre un período de

varios días. Típicamente, se identifican miles de clones celulares reactivos al antígeno, que representan miles de anticuerpos monoclonales individuales específicos del antígeno, por ejemplo específicos de GCC. La cantidad de anticuerpos monoclonales reactivos al antígeno diferentes identificados en un solo experimento aumenta típicamente en muchas veces. Después de aplicar ensayos rápidos basados en microplacas adicionales para medir y clasificar los anticuerpos por afinidad y función, se pueden seleccionar clones individuales de células B productoras de anticuerpos de calidad extremadamente elevada. Además, al omitir el paso de generación de hibridomas, la producción puede avanzar rápidamente hacia la elaboración de una línea celular recombinante. Se aíslan las células B individuales seleccionadas usando la tecnología y los genes de anticuerpos se pueden introducir directamente en una línea celular de producción. A continuación se puede desarrollar la línea celular resultante para realizar las pruebas clínicas esencialmente sobre la misma línea de tiempo que la requerida para el desarrollo de la línea celular de hibridomas.

[0127] El mAb 5F9 humano (IgG2, kappa) se puede producir con el hibridoma 5F9, también conocido como hibridoma 46.5F9.8.2, depositado el 10 de enero, 2007, a beneficio de Millennium Pharmaceuticals Inc., 40 Landsdowne Street, Cambridge, MA, 02139, EE.UU., en la *American Type Culture Collection*, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110, EE.UU., bajo el N° Acceso PTA-8132. (El depósito s e efectuó conforme a, y a satisfacción de, los requerimientos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para Fines de Procedimientos de Patentes.) La invención se relaciona con el hibridoma 5F9, con el anticuerpo producido por el mismo, con fragmentos de unión al antígeno

del mismo y con los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo y porciones de ellos (por ejemplo, la cadena pesada, la región variable de la cadena pesada, la cadena liviana, región variable de la cadena liviana, CDR). Según se describe en la presente, el hibridoma 5F9 produce un anticuerpo kappa, IgG2.

Tecnologías de humanización y de expresión y modificaciones de los anticuerpos

[0128] Según se describió precedentemente, la producción de anticuerpos con una inmunogenicidad reducida ofrece ventajas. Esto se puede lograr conjuntamente con técnicas de humanización y técnicas de expresión usando bibliotecas apropiadas. Se podrá apreciar que es posible humanizar o primatizar los anticuerpos de murinos o los anticuerpos de otras especies usando técnicas conocidas en el arte. Véase por ejemplo, Winter y Harris *Immunol Today* 14: 43-46 (1993) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992). El anticuerpo de interés se puede manipular mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir CH1, CH2, CH3, los dominios bisagra y/o el dominio de marco de trabajo por la correspondiente secuencia humana (véase WO 92/02190 y las Patentes de los EE.UU. Nº. 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.792, 5.714.350 y 5.777.085). Además, el uso de ADNc de Ig en la construcción de genes de inmunoglobulina quiméricos es conocido en el arte (Liu et al., *Proc Natl Acad Sci USA,* 84: 3439 (1987) y *J. Immunol.* 139: 3521 (1987)). Se aísla el ARNm de un hibridoma u otra célula productora del anticuerpo y se usa para producir ADNc: El ADNc de interés se puede amplificar usando la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (Patentes de los EE.UU. Nº. 4 .683.195 y 4.683.202).

[0129] Como alternativa, se puede usar la tecnología de expresión en

fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al, *Nature*, 348: 552- 553 (1990)) para producir anticuerpos humanos y fragmentos de anticuerpo in vitro, a partir de genes del dominio variable (V) de inmunoglobulinas, por ejemplo, a partir de repertorios de donantes no inmunizados. De acuerdo con esta técnica, los genes del dominio V del anticuerpo se clonan en-marco en un gen de una proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, tal como M13 o fd, y se expresan como fragmentos de anticuerpo funcionales sobre la superficie de la partícula de fago. Dado que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN de cadena simple del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica al anticuerpo que exhiba aquellas propiedades. Por consiguiente, el fago imita algunas de las propiedades de la célula B. La expresión en fagos se puede efectuar en una variedad de formatos; por una revisión sobre los mismos véase, por ejemplo, Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology*, 3: 564-571 (1993). Se pueden usar diversas fuentes de segmentos de genes V para la expresión en fagos. Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) aislaron un ordenamiento diverso de anticuerpos anti-oxazolona a partir de una pequeña biblioteca combinatoria aleatoria de genes V derivados de los bazos de ratones inmunizados. Se puede construir un repertorio de genes V a partir de donantes humanos no inmunizados y se pueden aislar anticuerpos contra un gran conjunto de antígenos (incluyendo auto-antígenos) usando esencialmente las técnicas que fueron descritas por Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581- 597 (1991), o Griffith et al, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Véanse también, las Patentes de los EE.UU. Nº. 5.565.332 y 5.573.905. Las bibliotecas de

expresión pueden contener anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos 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 de marco de trabajo humanas. (Véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. Nº. 6.300.064 (Knappik, et al.).)

[0130] Los anticuerpos humanos también se pueden generar en células B activadas *in vitro* (véanse las Patentes de los EE.UU. Nº: 5.567.610 y 5.229.275).

[0131] Las secuencias de los genes de la región constante humana se pueden consultar en Kabat et al., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, publicación del N.I.H. N° 91-3242. Los genes de la región C humanos se encuentran disponibles a partir de clones conocidos. La elección del isotipo estará indicada por las funciones efectoras deseadas, tal como fijación del complemento, o la actividad de citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. Los isotipos pueden ser IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En formas de realización particulares, las moléculas de anticuerpo de la invención son IgG1 e IgG2. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes, kappa o lambda, de la cadena liviana humana. El anticuerpo humanizado, quimérico es expresado luego mediante métodos convencionales.

[0132] En algunas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención puede dirigir la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) hacia una célula que expresa GCC, por ejemplo, una célula tumoral. Los anticuerpos con los isotipos IgG1 e IgG3 son de utilidad para producir una función efectora según una capacidad citotóxica dependiente del

anticuerpo, debido a su capacidad de unirse al receptor Fc. Los anticuerpos con los isotipos IgG2 e IgG4 son de utilidad para minimizar una respuesta ADCC debido a su baja capacidad de unirse al receptor Fc. En formas de realización relacionadas, se pueden efectuar sustituciones en la región Fc o cambios en la composición de glicosilación de un anticuerpo, por ejemplo, por crecimiento en una línea celular eucariota modificada, para mejorar la capacidad de los receptores Fc para reconocer, unir y/o mediar la citotoxicidad para las células a las cuales se unen los anticuerpos anti-GCC (véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nº. 7.317.091, 5.624.821 y las publicaciones que incluyen 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 determinadas formas de realización, el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno (por ejemplo, un anticuerpo de origen humano, un anticuerpo humano) puede incluir sustituciones o reemplazos de aminoácidos que alteran o adaptan la función (por ejemplo, la función efectora). Por ejemplo, se puede diseñar una región constante de origen humano (por ejemplo, la región constante γ1, la región constante γ2) para reducir la activación del complemento y/o la unión al receptor Fc. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EEUU Nº. 5.648.260 (Winter *et al.*), 5.624.821 (Winter *et al.*) y 5.834.597 (Tso *et al.*), cuyas enseñanzas completas se incorporan en la presente a modo de referencia.) Preferentemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene dichas sustituciones o reemplazos de aminoácidos es al menos un 95% idéntica aproximadamente sobre la longitud completa con la secuencia de aminoácidos de la región constante de

origen humano no alterada, más preferentemente al menos un 99% idéntica aproximadamente sobre la longitud completa con la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada.

[0133] En aún otra forma de realización, las funciones efectoras también pueden ser alteradas por modulación del patrón de glicosilación del anticuerpo. El término alteración significa suprimir uno o más de los grupos de carbohidratos presentes en el anticuerpo y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en el anticuerpo. Por ejemplo, los anticuerpos de mayores actividades ADCC, con una estructura de carbohidratos madura sin fucosa unida a la región Fc del anticuerpo, se describen en la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº. 2003/0157108 (Presta). Véase también la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº. 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Glycofi también ha desarrollado líneas celulares de levadura capaces de producir glicoformas de anticuerpos específicas.

[0134] Además, o como alternativa, se puede elaborar un anticuerpo que tiene un tipo de glicosilación alterado, tal como un anticuerpo hipofucosilado que contiene cantidades reducidas de residuos fucosilo o un anticuerpo con más estructuras GlcNAc divididas en dos. Se ha demostrado que dichos patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de producir ADCC. Dichas modificaciones de los hidratos de carbono pueden efectuarse, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula huésped con la maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con la maquinaria de glicosilación alterada, se pueden usar como células huésped manipuladas para expresar los anticuerpos recombinantes de la

invención, y de este modo, producir un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, en EP 1.176.195 de Hang et al., se describe una línea celular con un gen FUT8 funcionalmente interrumpido, que codifica una fucosilo transferasa, de manera tal que los anticuerpos expresados en dicha línea celular exhiben una hipofucosilación. En la publicación PCT WO 03/035835 de Presta se describe una variante de la línea celular CHO, las células Lec13, con una capacidad reducida para unir fucosa a carbohidratos unidos a Asn(297), que también da como resultado una hipofucosilación de los anticuerpos expresados en dicha célula huésped (véase también Shields, R. L. et al., 2002 *J. Biol. Chem.* 277: 26733-26740). En la publicación PCT WO 99/54342 de Umana et al., se describen líneas celulares manipuladas para expresar glucosilo transferasas modificadoras de glucoproteínas (por ejemplo, la beta(1,4)-N acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de manera tal que los anticuerpos expresados en las líneas celulares expresadas exhiben una mayor cantidad de estructuras GlcNac divididas en dos, lo cual da como resultado una mayor actividad ADCC de los anticuerpos (véase también Umana et al., 1999 *Nat. Biotech.* 17: 176-180).

[0135] Los anticuerpos humanizados también se pueden elaborar usando un enfoque de injertos de CDR. Las técnicas de generación de dichos anticuerpos humanizados son conocidas en el arte. En general, los anticuerpos humanizados se producen por obtención de secuencias de ácidos nucleicos que codifican las secuencias variables pesadas y variables livianas de un anticuerpo que se une a GCC, identificación de la región determinante de la complementariedad o "CDR" en las secuencias variables pesadas y variables liviana e injerto de las secuencias de ácidos nucleicos de la CDR sobre las

secuencias de ácidos nucleicos del marco de trabajo humano. (Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nº. 4.816.567 y 5.225.539). Se puede determinar la ubicación de los residuos de la CDR y del marco de trabajo (véase, Kabat, E.A., *et al.,* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, *U.S. Department of Health and Human Services*, publicación de NIH N° 91-3242, y Chothia, C. et al. *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Las moléculas de anticuerpo anti-GCC que se describen en la presente tienen las secuencias de aminoácidos de la CDR y las secuencias de ácidos nucleicos que codifican las CDR enumeradas en las Tablas 5 y 6. En algunas formas de realización, las secuencias de las Tablas 5 y 6 se pueden incorporar en las moléculas que reconocen a la GCC para su uso en los métodos terapéuticos o de diagnóstico que se describen en la presente. El marco de trabajo humano que se selecciona es aquel que es adecuado para una administración in vivo, lo que significa que no exhibe inmunogenicidad. Por ejemplo, dicha determinación se puede basar en la experiencia anterior con el uso in vivo de dichos anticuerpos y estudios de las similitudes de aminoácidos. Se puede seleccionar una región de marco de trabajo adecuada de un anticuerpo de origen humano que tiene al menos un 65% de identidad de secuencia de aminoácidos aproximadamente, y preferentemente al menos un 70%, 80%, 90% o 95% de identidad de secuencia de aminoácidos aproximadamente sobre toda la longitud de la región de marco de trabajo dentro de la secuencia de aminoácidos de la porción equivalente (por ejemplo, la región de marco de trabajo) del anticuerpo donante, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC (por ejemplo, 3G1). La identidad de secuencias de aminoácidos se puede determinar usando un algoritmo de

alineación de secuencias de aminoácidos adecuado, tal como CLUSTAL W, usando los parámetros predeterminados. (Thompson J.D. *et al., Nucleic Acids Res.* 22:4673-4680 (1994).)

[0136] Una vez identificadas las CDR y FR del anticuerpo clonado a humanizar, las secuencias de aminoácidos que codifican las CDR se identifican y las correspondientes secuencias de ácidos nucleicos injertadas sobre las FR humanas seleccionadas. Esto se puede efectuar usando cebadores y conectores conocidos, cuya selección es conocida en el arte. Todas las CDR de un anticuerpo humano particular se pueden reemplazar con al menos una porción de una CDR no humana o solamente algunas de las CDR se pueden reemplazar con CDR no humanas. Solamente es necesario reemplazar la cantidad de CDR requeridas para la unión del anticuerpo humanizado a un antígeno predeterminado. Después de injertar las CDR sobre las FR humanas seleccionadas, las secuencias variables pesadas y variables livianas resultantes se expresan para producir un Fv humanizado o un anticuerpo humanizado que se une a GCC. Preferentemente, el anticuerpo con injertos de CDR (por ejemplo, humanizado) se une a una proteína GCC con una afinidad similar, sustancialmente igual o mejor que la del anticuerpo donante. Típicamente, las secuencias variables pesadas y livianas humanizadas se expresan como una proteína de fusión con las secuencias de dominios constantes humanos para así obtener un anticuerpo intacto que se une a GCC. Sin embargo, se puede producir un anticuerpo Fv humanizado que no contiene a las secuencias constantes.

[0137] También se encuentran dentro del alcance de la invención, anticuerpos humanizados en los cuales se han sustituido, suprimido o

agregado aminoácidos específicos. En particular, los anticuerpos humanizados pueden contener sustituciones de aminoácidos en la región del marco de trabajo, tal como para mejorar la unión al antígeno. Por ejemplo, se puede reemplazar una cantidad pequeña, seleccionada, de residuos del marco de trabajo aceptor de la cadena de inmunoglobulina humanizada por los correspondientes aminoácidos donantes. Las ubicaciones de las sustituciones incluyen residuos de aminoácidos adyacentes a la CDR, o que tienen la capacidad de interactuar con una CDR (véase por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nº. 5.585.089 o 5.859.205). El marco de tra bajo aceptor puede ser una secuencia de marco de trabajo del anticuerpo humano maduro o puede ser una secuencia consenso. Según se usa en la presente, el término "secuencia consenso" se refiere a la secuencia más frecuente o diseñado con los residuos más comunes en cada posición en la secuencia en una región entre miembros de familia relacionados. Existen numerosas secuencias consenso de anticuerpos humanos disponibles, incluyendo secuencias consenso para los diferentes subgrupos de regiones variables humanas (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 a través de IgBLAST en *National Center for Biotechnology Information*, Bethesda, MD (también véase, Johnson, G. y Wu, T.T., *Nucleic Acids Research* 29: 205-206 (2001)).

[0138] Otras técnicas de humanización de anticuerpos se describen en Padlan et al., EP 519596 A1, publicada el 23 de diciembre, 1992.

[0139] La molécula de anticuerpo anti-GCC incluye otros anticuerpos

humanizados que también se pueden modificar por supresión específica de human epitopes de células T o "desinmunización" utilizando los métodos divulgados en las publicaciones PCT N°WO 98/52976 y WO 00/34317, cuyos contenidos se incorporan en la presente a modo de referencia. Brevemente, se pueden analizar las regiones variables de la cadena pesada y liviana de un anticuerpo anti-GCC de murinos por los péptidos que se unen a MHC Clase II; estos péptidos representan potenciales epitopes de células T. Para la detección de los potenciales epitopes de células T, se puede aplicar un enfoque de modelación por computadora denominado "homología remota de péptidos" y además se pueden efectuar búsquedas en una base de datos de péptidos de unión a MHC clase II humanos de motivos presentes en las secuencias VH y VL de murinos, como se describe en las publicaciones PCT N°WO 98/52976 y WO 00/34317. Estos motivos se une n a cualquiera de los 18 alotipos DR del MHC mayor de clase II, y que por consiguiente constituyen potenciales epitopes de células T. Los potenciales epitopes de células T detectados se pueden eliminar por sustitución de un número pequeño de residuos de aminoácidos en las regiones variables, o preferentemente, por sustituciones de aminoácidos individuales. En la medida de lo posible, se efectúan sustituciones conservadoras, a menudo pero no exclusivamente, se puede usar un aminoácido común en esta posición en las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana. Las secuencias de la 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). La base de datos V BASE provee una base de datos comprensible de secuencias de la región variable de la

inmunoglobulina humana (compiladas por Tomlinson, I.A. et al., *MRC Centre for Protein Engineering*, Cambridge, RU). Después de construir las VH y VL desinmunizadas de un anticuerpo anti-GCC por mutagénesis de los genes VH y VL de murinos, la secuencia variable mutagenizada se puede fusionar, opcionalmente, con una región constante humana, por ejemplo, las regiones constantes de IgG1 o κ humanas.

[0140] En otras formas de realización, la reducción de una respuesta inmunogénica por un anticuerpo con injerto de CDR se logra mediante cambios, por ejemplo, supresiones, sustituciones, de residuos de aminoácidos en las CDR (Kashmiri et al., *Methods* 36: 25-34 (2005), Patente de los EE.UU. Nº. 6.818.749, Tan et al. *J. Immunol.* 169: 1119-1125 (2006)). Por ejemplo, preferentemente no se cambiarían los residuos en las posiciones involucradas que están en contacto con el antígeno. Típicamente, dichos residuos, los SDR, se encuentran en posiciones que presentan niveles elevados de variabilidad entre anticuerpos. Las secuencias consenso (por ejemplo, las SEQ ID Nº. 302-307, Tabla 5) derivadas, por ejemplo, según el método de Clustal (Higgins D. G. et al., *Meth. Enzymol.* 266: 383-402 (1996)), de las moléculas de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, de los anticuerpos que se describen en la presente, ayudan a identificar los SDR. En las moléculas de anticuerpo anti-GCC humanas que se describen en la presente, los SDR son los siguientes: al menos el primer residuo o, en algunas formas de realización, los primeros cuatro residuos de la CDR1 de la cadena pesada; al menos la porción N-terminal, por ejemplo, los primeros siete, diez o 13 residuos de la CDR2 de la cadena pesada; casi toda la CDR3 de la cadena pesada; la porción C-terminal, por ejemplo, después del residuo seis, ocho o nueve de la CDR1 de la cadena

liviana; aproximadamente el primero, el del medio y/o el último residuo de la CDR2 de la cadena liviana; y la mayor parte de la CDR3 de la cadena liviana, o al menos después de los residuos dos o tres. Por lo tanto, para mantener la unión a la proteína GCC después de la humanización o de la modificación de una molécula de anticuerpo anti-GCC, dichos residuos SDR en las CDR de las moléculas de anticuerpo anti-GCC son menos sujetas a cambios, por ejemplo, de residuos de murinos a residuos consenso humanos que otro residuos de las CDR o de las regiones de marco de trabajo. A la inversa, puede resultar beneficioso cambiar los residuos en las CDR no humanas, por ejemplo de murinos, por residuos identificados como consenso en las CDR humanas, por ejemplo, las CDR de moléculas de anticuerpo anti-GCC que se describen en la presente (por ejemplo, las secuencias enumeradas en la Tabla 5). Por ejemplo, una serina puede representar un residuo humano para el extremo C-terminal de la CDR1 de la cadena pesada y/o una tirosina puede representar un residuo humano para el segundo y/o tercer residuos de la CDR1 de la cadena pesada; la CDR2 de la 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 residuos y/o un aspartato en seis a nueve residuos en la CDR3 de la cadena pesada; la CDR1 de la cadena liviana puede comenzar con (K/R)-(A/S)-SQS-(V/L)-(S/L) (SEQ ID Nº. 313) para representar una CDR humana; la CDR2 de la cadena liviana puede tener una serina en el tercer residuo y/o una arginina en el quinto residuo para representar una CDR humana; y/o la CDR3 de la cadena liviana puede tener una glutamina en el segundo residuo y/o una tirosina o una serina en el tercer residuo para representar una CDR humana.

[0141]Los anticuerpos anti-GCC que no son anticuerpos intactos también son de utilidad en esta invención. Dichos anticuerpos pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos que se describieron previamente. Las moléculas de anticuerpo de este tipo que son de utilidad incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región de la bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341: 544-546 (1989)), que consiste de un dominio VH; (vii) un dominio funcional único en la cadena pesada del anticuerpo, que consiste de un dominio VHH (conocido como nanocuerpo) véase por ejemplo, Cortez-Retamozo, et al., *Cancer Res* 64: 2853-2857(2004), y las referencias citadas en la misma; y (vii) una CDR aislada, por ejemplo, una o más CDR aisladas junto con un marco de trabajo suficiente como para proveer un fragmento de unión al antígeno. Aún más, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un ligador sintético que permite obtenerlas como una sola cadena proteica en la cual las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena simple (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). Estos anticuerpos de cadena simple también quedan incluidos en el término "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los

especialistas en el arte, y los fragmentos se examinan por su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Los fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, $F(ab')_2$ y Fab, se pueden preparar por clivaje de la proteína intacta, por ejemplo por clivaje químico o con proteasas.

[0142] En formas de realización, se pueden usar algunas o todas las secuencias de CDR, de una o ambas cadenas pesada y liviana, en otra molécula de anticuerpo, por ejemplo, en una molécula de anticuerpo con injertos de CDR, humanizada o quimérica.

[0143] Las formas de realización incluyen una molécula de anticuerpo que comprende suficientes CDR, por ejemplo, las seis CDR de uno de los hibridomas humanos, de linfocitos seleccionados o de anticuerpos de murinos a los que se hizo referencia previamente para permitir la unión a la GCC de la superficie celular.

[0144] En una forma de realización, las CDR, por ejemplo, todas las HCDR o todas las LCDR o las seis, se incluyen en las regiones de marco de trabajo humanas o derivadas de humanos. Los ejemplos de regiones de marco de trabajo humanas incluyen secuencias de marcos de trabajo de la línea germinal humana, secuencias de la línea germinal humana maduradas por afinidad (ya sea *in vivo* o *in vitro*) o secuencias humanas sintéticas, por ejemplo, secuencias consenso. En una forma de realización, el marco de trabajo de la cadena pesada es un marco de trabajo de IgG1 o IgG2. En una forma de realización, el marco de trabajo de la cadena liviana es un marco de trabajo kappa.

[0145] En una forma de realización, 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 que se describen en la presente, por ejemplo, las secuencias enumeradas en la Tabla 5, para su unión a la GCC. (Los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos que pueden codificar las secuencias de aminoácidos de CDR enumeradas en la Tabla 5, se proveen en la Tabla 6 en la presente). En formas de realización particulares, una molécula de anticuerpo anti-GCC puede comprender las CDR de 5F9 o Abx-229.

[0146] Los fragmentos de anticuerpo para uso terapéutico o de diagnóstico *in vivo* se pueden mejorar con modificaciones que aumentan sus vidas medias en suero. Los grupos orgánicos adecuados destinados a incrementar la vida media en suero *in vivo* del anticuerpo pueden incluir, dos o más grupos lineales o ramificados seleccionados entre un grupo polimérico hidrofílico (por ejemplo, un polímero lineal o ramificado (por ejemplo, un polialcanglicol tal como polietilenglicol, monometoxi-polietilenglicol y semejantes), un carbohidrato (por ejemplo, un dextrano, una celulosa, un polisacárido y semejantes), un polímero de un aminoácido hidrofílico (por ejemplo, polilisina, poliaspartato y semejantes), un óxido de polialcano y polivinilpirrolidona), un grupo ácido graso (por ejemplo, un ácido monocarboxílico o un ácido dicarboxílico), un grupo éster de ácidos grasos, un grupo lípido (por ejemplo, un grupo diacilglicerol, un grupo de esfingolípido (por ejemplo, ceramidilo)) o un grupo fosfolípido (por ejemplo, un grupo fosfatidiletanolamina). Preferentemente, el grupo orgánico está unido a un sitio predeterminado donde dicho grupo orgánico no deteriore la función (por ejemplo, disminuya la afinidad de unión al antígeno) del inmunoconjugado resultante en comparación con la porción de anticuerpo no conjugado. El

grupo orgánico puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 500 Da y aproximadamente 50.000 Da, preferentemente de 2000, 5000, 10.000 ó 20.000 Da aproximadamente. Los ejemplos y métodos para modificar polipéptidos, por ejemplo, anticuerpos, con grupos orgánicos se pueden consultar, por ejemplo, en las Patentes de los EE.UU. Nº. 4.179.337 y 5.612.460, en las publicaciones PCT N°WO 95/06058 y WO 00/26256 y en la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº. 20030026805.

[0147] Una molécula de anticuerpo anti-GCC puede comprender todas, o un fragmento de unión al antígeno de la región variable, de una o ambas, cadenas pesadas y livianas, de uno de los anticuerpos de hibridomas humanos, anticuerpos de linfocitos seleccionados o anticuerpos de murinos a los que se hizo referencia previamente.

[0148] En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de (a) puede diferir de una de las secuencias de aminoácidos de referencia a las cuales se hizo referencia en (a)(i-ii) en tanto como 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 15 residuos. En formas de realización las diferencias son sustituciones conservadoras. En formas de realización, las diferencias se encuentran en las regiones de marco de trabajo. En una forma de realización, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de (b) puede diferir de una de las secuencias de aminoácidos de referencia a las cuales se hizo referencia en (b)(i-ii) en tanto como 1, 2, 3, 4, 5, 10 ó 15 residuos. En formas de realización las diferencias son sustituciones conservadoras. En formas de realización las diferencias se encuentran en las regiones de marco de trabajo.

[0149] En una forma de realización la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende una o ambas de:

(a) una secuencia de aminoácidos de la cadena liviana de todas, o de un fragmento de unión al antígeno, ya sea, de (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana de la Tabla 3, por ejemplo, la SEQ ID Nº: 20, o (ii) un aminoácido de la región variable de la cadena liviana codificada por una secuencia de nucleótidos de la Tabla 4, por ejemplo, la SEQ ID Nº: 19; y

(b) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de todas, o de un fragmento de unión al antígeno, ya sea, de (i) una secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de la Tabla 3, por ejemplo, la SEQ ID Nº: 18, o (ii) una secuencia de aminoácidos de la cadena pesada codificada por una secuencia de nucleótidos de la Tabla 4, por ejemplo, la SEQ ID Nº: 17.

[0150] En una forma de realización la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende una o ambas de:

a) una región variable de la cadena liviana, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, que tiene al menos 85, 90, 95, 97 ó 99% de homología con la región variable de la cadena liviana de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, uno de los anticuerpos de hibridoma humano, de linfocitos seleccionados o anticuerpos de murinos a los cuales se hizo referencia previamente; y

(b) una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, que tiene al menos 85, 90, 95, 97 ó 99% de homología con la región variable de la cadena pesada de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, uno de los anticuerpos de hibridoma humano, de linfocitos seleccionados o

anticuerpos de murinos a los cuales se hizo referencia previamente.

[0151] Las secuencias de aminoácidos de las regiones variables de anticuerpos del hibridoma humano, de anticuerpos de linfocitos seleccionados y de anticuerpos de murinos se pueden consultar en la Tabla 3.

[0152] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es una molécula de anticuerpo 5F9 e incluye uno o ambos de: a) todo o un fragmento de la región constante de la cadena pesada de la SEQ ID Nº: 231; y b) todo o un fragmento de la región constante de la cadena liviana de la SEQ ID Nº: 233.

[0153] En otra forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es una molécula de anticuerpo Abx-229 e incluye uno o ambos de: a) todo o un fragmento de unión a GCC de la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID Nº: 46; y b) todo o un fragmento de unión a GCC de la región variable de la cadena liviana de la SEQ ID Nº: 48.

[0154] En un enfoque, se pueden usar las secuencias consenso que codifican las regiones J de las cadenas pesada y liviana para diseñar oligonucleótidos para su uso como cebadores para introducir sitios de restricción útiles en la región J para la unión subsiguiente de segmentos de la región V a segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C se puede modificar por mutagénesis dirigida al sitio para ubicar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

[0155] Los vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, cósmidos, YAC, episomas derivados de EBV y semejantes. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia CH o CL de una inmunoglobulina humana funcionalmente completa, con sitios de restricción

apropiados manipulados para que cualquier secuencia VH o VL se pueda insertar y expresar fácilmente. En dichos vectores, el procesamiento habitualmente se produce entre el sitio de procesamiento donante en la región J insertada y el sitio de procesamiento del aceptor que precede a la región C humana, y también en las regiones de procesamiento que se encuentran dentro de los exones CH humanos. Los vectores de expresión adecuados pueden contener numerosos componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen de un marcador seleccionable, uno o más elementos de control de la expresión, tal como un elemento de control de la transcripción (por ejemplo, un promotor, un potenciador, un terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia señal o una secuencia directriz y semejantes. La poliadenilación y la terminación de la transcripción tienen lugar en sitios cromosómicos nativos 5' con respecto a las regiones de codificación. El anticuerpo quimérico resultante se puede unir a cualquier promotor fuerte. Los ejemplos de vectores adecuados que se pueden usar incluyen aquellos que son adecuados para huéspedes de mamífero y basados en sistemas de replicación virales, tales como el virus de simio 40 (SV40), el virus del sarcoma de Rous (RSV), el adenovirus 2, el virus de papiloma bovina (BPV), el papovavirus BK mutante (BKV) o el citomegalovirus (CMV) de ratón y humano y el virus de leucemia Moloney de murinos (MMLV), promotores de Ig nativos, etc. Una variedad de los vectores adecuados son conocidos en el arte, incluyendo los vectores que se mantienen como copias individuales o como múltiples copias, o que se integran en el cromosoma de la célula huésped, por ejemplo, a través de LTR o a través de cromosomas artificiales manipulados con múltiples sitios de integración (Lindenbaum et al., *Nucleic Acids Res.*

32:e172 (2004), Kennard et al. *Biotechnol. Bioeng.*, en línea, 20 de mayo, 2009). En una sección posterior se enumeran ejemplos de vectores adecuados adicionales.

[0156] Por consiguiente, la invención provee un vector de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo humano, humanizado, quimérico o un fragmento de unión al antígeno de cualquiera de los anteriores), una cadena de anticuerpo (por ejemplo, la cadena pesada, la cadena liviana) o una porción de unión al antígeno de una cadena de anticuerpo que se une a una proteína GCC.

[0157] La expresión en células huésped eucariotas es de utilidad porque es más probable que en dichas células se ensamble y secrete un anticuerpo plegado apropiadamente y activo inmunológicamente que en células procariotas. Sin embargo, cualquier anticuerpo producido que sea inactivo debido a un plegamiento inapropiado 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, páginas 459-89 (1982)). Es posible que las células huésped producirán porciones intactas de anticuerpos, tales como dímeros de la cadena liviana o dímeros de la cadena pesada, que también son homólogos de los anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

[0158] Además, según se describe en otra parte en la presente, los anticuerpos humanos o los anticuerpos de otras especies se pueden generar mediante tecnologías de tipo expresión, incluyendo, en un sentido no limitativo, expresión en fagos, expresión retroviral, expresión ribosomal y otras técnicas,

usando técnicas bien conocidas en el arte y las moléculas resultantes se pueden someter a una maduración adicional, tal como maduración por afinidad, ya que tales técnicas son conocidas en el arte. Winter y Harris *Immunol Today* 14: 43-46 (1993) y Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12125-168 (1992), Hanes y Plucthau PNAS USA 94: 4937-4942 (1997) (expresión ribosomal), Parmley y Smith Gene 73: 305-318 (1988) (expresión 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 Patente de los EE.UU. N°. 5.733.743. Si se usan tecnologías de expresión para producir anticuerpos que no son humanos, dichos anticuerpos se pueden humanizar como se describió precedentemente.

[0159] Se podrá apreciar que no es necesario que los anticuerpos generados posean un isotipo deseado particular sino más bien el anticuerpo generado pueda tener cualquier isotipo. Por ejemplo, el anticuerpo producido por el hibridoma 5F9 (ATCC, N° depósito PTA-8132) tiene el isotipo IgG2. El isotipo del anticuerpo se puede cambiar después, por ejemplo, a la IgG1 o a la IgG3 para generar una respuesta ADCC cuando el anticuerpo se une a GCC sobre una célula, usando técnicas convencionales que son conocidas en el arte. Dichas técnicas incluyen el uso de técnicas recombinantes directas (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°. 4.816.397), técnicas de fusión de célula-célula (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N°. 5.916.771), entre otras. En la técnica de fusión de célula-célula, se prepara un mieloma u otra línea celular que contenga una cadena pesada de cualquier isotipo deseado y se prepara otro mieloma u otra línea celular que contenga la

cadena liviana. A continuación, dichas células se pueden fusionar y se puede aislar una línea celular que expresa un anticuerpo intacto.

[0160] En determinadas formas de realización, la molécula de anticuerpo GCC es un anticuerpo anti-GCC IgG1 humano. Dado que dichos anticuerpos presentan la unión deseada a la molécula de GCC, se puede cambiar fácilmente el isotipo de cualquiera de dichos anticuerpos para generar un isotipo de IgG4 humana, por ejemplo, en tanto continúa teniendo la misma región variable (que define la especificidad y afinidad del anticuerpo, hasta un cierto grado). Por lo tanto, como se general anticuerpos candidato que cumplen con los atributos "estructurales" deseados según se describió precedentemente, en general se pueden proveer con al menos determinados atributos "funcionales" deseables adicionales por el cambio de isotipo.

[0161] En una forma de realización, la región variable, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, se puede acoplar a una región constante (o un fragmento de la misma) distinta de la región constante si se generó, por ejemplo, con una región constante (o un fragmento de la misma) de otro anticuerpo o con una región constante sistémica (o un fragmento de la misma). En formas de realización, la región constante es una región constante de IgG1 o IgG2 (o un fragmento de la misma). Los cambios de secuencia se pueden efectuar en las regiones variables o constantes para modificar la actividad efectora de la molécula de anticuerpo.

Diseño y generación de otras formas terapéuticas

[0162] Los anticuerpos producidos y caracterizados en la presente con respecto a la GCC proveen el diseño de otras modalidades terapéuticas inclusive facilitan otros anticuerpos, otros antagonistas o grupos químicos

distintos de anticuerpos. Dichas modalidades incluyen, en un sentido no limitativo, anticuerpos que tienen una actividad o funcionalidad de unión similar, una terapéutica avanzada con anticuerpos, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunoconjugados y terapéuticos radiomarcados, generación de terapéuticos peptídicos, en particular intracuerpos [*intrabodies*] y moléculas pequeñas. Aún más, según se describió precedentemente, la función efectora de los anticuerpos de la invención se puede cambiar por conmutación del isotipo por una IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA1, IgA2, IgE o IgM para diversos usos terapéuticos.

[0163] En relación con los anticuerpos biespecíficos, se pueden generar anticuerpos biespecíficos que comprenden (i) dos anticuerpos, uno con una especificidad por GCC y otro por una segunda molécula conjugados entre sí, (ii) un solo anticuerpo que contiene una cadena específica de GCC y una segunda cadena específica de una segunda molécula o (iii) un anticuerpo de cadena simple que tiene especificidad por GCC y la otra molécula. Dichos anticuerpos biespecíficos se pueden generar usando técnicas que son conocidas. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de tipos diferentes). Los agentes de entrecruzamiento apropiados incluyen aquellos que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos con reactividades diferentes separados por un espaciador apropiado (por ejemplo el éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida), o aquellos que son homobifuncionales (por ejemplo, el suberato de disuccinimidilo). Estos conectores están disponibles en 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.* 12125-168 (1992) y con relación a (iii) véase por ejemplo, Traunecker et al. *Int. J. Cancer* (Supl.) 7: 51-52 (1992). Songsivilai & Lachmann Clin. *Exp. Immunol.* 79: 315-321 (1990), Kostelny et al. *J. Immunol.* 148: 1547-1553 (1992).

[0164] Además, también se pueden preparar "Kappacuerpos [*Kappabodies*]" (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 [*Minibodies*]" (Martin et al., *EMBO J* 13: 5303-9 (1994), Patente de los EE.UU. Nº. 5.837.821), "Diacuerpos [*Diabodies*]" (Holliger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas [*Janusins*]" (Traunecker et al., *EMBO J* 10: 3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int J Cancer*, Supl. 7: 51-52 (1992)).

Ácidos nucleicos y polipéptidos

[0165] En otra forma de realización, la presente invención se relaciona con secuencias de polinucleótidos y polipéptidos que codifican o representan las moléculas de anticuerpo que se describen en la presente. Dichos polinucleótidos codifican ambas regiones variable y constante de cada una de las cadenas pesadas y livianas, aunque la presente invención también contempla otras combinaciones de acuerdo con las composiciones que se describen en la presente. La presente invención también contempla fragmentos de oligonucleótidos derivados de las secuencias de polinucleótidos y ácidos nucleicos divulgadas que son complementarias de estos polinucleótidos.

[0166] Los polinucleótidos se pueden encontrar en la forma de ARN o ADN. Los polinucleótidos en la 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 de cadena doble o de cadena simple, y si es de cadena simple, puede ser la cadena de codificación (orientada en el sentido del marco de lectura) o la cadena no codificante (antisentido). La secuencia de codificación que codifica el polipéptido puede ser idéntica a la secuencia de codificación provista en la presente o puede ser una secuencia de codificación diferente, donde la secuencia de codificación, como resultado de la redundancia o degeneración del código genético, codifica el mismo polipéptido que el ADN provisto en la presente.

[0167] En las formas de realización provistas, los polinucleótidos codifican al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una región variable de la cadena liviana de la presente invención, por ejemplo, las que se resumen en la Tabla 4.

[0168] La presente invención también incluye variantes de polinucleótidos que contienen modificaciones, tales como supresiones, sustituciones o adiciones de polinucleótidos, y cualquier modificación de polipéptidos que resultara de la variante de la secuencia de polinucleótidos. Un polinucleótido de la presente invención también puede tener una secuencia de codificación que es una variante de la secuencia de codificación provista en la presente. Por ejemplo, una variante de polinucleótido puede presentar al menos un 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% de identidad con un polinucleótido indicado en la Tabla 4. En formas de realización, la variante de polinucleótido codifica una molécula de anticuerpo anti-GCC.

[0169] La presente invención se relaciona además con 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 naturalmente o polipéptidos sintéticos. El fragmento, derivado o análogo de los polipéptidos de la presente invención puede ser uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado) y dicho residuo de aminoácido sustituido puede estar codificado, o no, por el código genético; o puede ser uno en el cual uno o más de los residuos de aminoácidos incluye un grupo sustituyente; o puede ser uno en el cual el polipéptido está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol); o puede ser uno en el cual los aminoácidos adicionales están fusionados al polipéptido, tal como una secuencia directriz o secretora o una secuencia que se emplea para purificar el polipéptido o una secuencia de una proproteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos se encuentran dentro del alcance de la presente invención. En diversos aspectos, los polipéptidos de la invención pueden ser un producto parcialmente purificado o un producto purificado.

[0170] Un polipéptido de la presente invención puede tener una secuencia de aminoácidos que es idéntica a la de los anticuerpos que se describen en la presente, por ejemplo, las que se resumen en las Tablas 2 ó 3, o que es diferente por variaciones menores debido a una o más sustituciones de aminoácidos. La variación puede ser un "cambio conservador", típicamente en el rango de entre 1 y 5 aminoácidos aproximadamente, en donde el aminoácido sustituido tiene propiedades estructurales o químicas similares, por ejemplo, el reemplazo de leucina por isoleucina o treonina por serina; el reemplazo de lisina por arginina o histidina. Por el contrario, las variaciones

pueden incluir cambios no conservadores, por ejemplo, el reemplazo de una glicina por un triptofano. Las variaciones menores similares también pueden incluir supresiones o inserciones de aminoácidos, o ambas. Es posible hallar una guía para determinar cuáles y cuántos residuos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o eliminar, sin cambiar la actividad biológica o inmunológica, usando programas para computadora bien conocidos en el arte, por ejemplo, el software DNASTAR (DNASTAR, Inc., Madison, Wis.).

[0171] En otro aspecto, la invención caracteriza ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican moléculas de anticuerpo anti-GCC. En formas de realización, los ácidos nucleicos codifican una o más entre una molécula de anticuerpo, una cadena pesada, una cadena liviana, una región variable de la cadena liviana, una región variable de la cadena pesada, porciones de las cadenas pesadas y las cadenas livianas de las moléculas de anticuerpo descritas en la presente (por ejemplo, un fragmento de una región variable de la cadena liviana que cuando se aparea con una región variable de la cadena pesada de longitud completa se une al antígeno, o un fragmento de una región variable de la cadena pesada que cuando se aparea con una región variable de la cadena liviana de longitud completa se une al antígeno) y CDR. Las formas de realización incluyen dichos ácidos nucleicos dispuestos en vectores, por ejemplo, en vectores de expresión. En formas de realización específicas, la invención incluye los plásmidos pTOK58D-5F9LC y pTOK58D-5F9HC. Aún más, la invención abarca moléculas de anticuerpo producidas por células huésped, por ejemplo, que expresan las moléculas de anticuerpo codificadas por los plásmidos pTOK58D-5F9LC y pTOK58D-5F9HC.

[0172] En una forma de realización, se provee un vector, por ejemplo, un

vector de expresión, que comprende una o ambas de:

[0173] secuencias que codifican una región variable de la cadena liviana, por ejemplo, las secuencias enumeradas en la Tabla 4, un fragmento de unión al antígeno de las mismas, o una, dos o tres CDR de una cadena liviana (y opcionalmente una región de marco de trabajo), que se describen en la presente, por ejemplo, en la Tabla 6; y

[0174] secuencias que codifican una región variable de la cadena pesada, por ejemplo, las secuencias enumeradas en la Tabla 4, un fragmento de unión al antígeno de las mismas, o una, dos o tres CDR de una cadena pesada (y opcionalmente una región de marco de trabajo), que se describen en la presente, por ejemplo, en la Tabla 6.

[0175] En las formas de realización provistas, los polinucleótidos codifican al menos una región variable de la cadena pesada o al menos una región variable de la cadena liviana de los anticuerpos de la presente invención. En las formas de realización provistas, los polipéptidos pueden codificar al menos una región variable de la cadena pesada y una región variable de la cadena liviana de los anticuerpos de la presente invención.

[0176] En una forma de realización la molécula de anticuerpo anti-GCC comprende una o ambas de:

(a) una región variable de la cadena liviana, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, codificada por un ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones de severidad seleccionadas con, (i) el complemento de una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en la presente, por ejemplo, en la Tabla 4, o (ii) cualquier secuencia de ácido nucleico que codifica una cadena

liviana de una molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención, por ejemplo, uno de los anticuerpos del hibridoma humano, anticuerpos de linfocitos seleccionado o anticuerpos de murinos a las cuales se hizo referencia precedentemente y que se resumen en las Tablas 1 y 2; y

(b) una región variable de la cadena pesada, o un fragmento de unión al antígeno de la misma, codificada por un ácido nucleico que se hibridiza bajo condiciones de severidad seleccionadas con, (i) el complemento de una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en la presente, 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, uno de los anticuerpos del hibridoma humano, anticuerpos de linfocitos seleccionado o anticuerpos de murinos a las cuales se hizo referencia precedentemente y que se resumen en las Tablas 1 y 2.

[0177] En una forma de realización, las condiciones de severidad seleccionadas son condiciones de severidad elevada o de severidad muy elevada, por ejemplo, como las condiciones que se describen en la presente.

[0178] En aspectos adicionales, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena liviana del anticuerpo codificado por el ADN con el N° Acceso de ATCC PTA-8132. En otros aspectos adicionales, el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno comprende una secuencia de aminoácidos de la secuencia de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo codificado por el ADN con el N° Acceso de ATCC PTA-8132.

[0179] La presente invención también provee vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención, células huésped que son manipuladas genéticamente con los vectores de la presente invención y la producción de los anticuerpos de la presente invención mediante técnicas recombinantes.

[0180] La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en sitios de endonucleasas de restricción apropiadas mediante procedimientos conocidos en el arte. La secuencia de polinucleótidos en el vector de expresión está ligada operativamente a una secuencia de control de la expresión apropiada (es decir, un promotor) para dirigir la síntesis del ARNm. Los ejemplos de dichos promotores incluyen, pero en un sentido no limitativo, el de LTR del virus del sarcoma de Rous o el promotor SV40 temprano o tardío, el de lac o trp de *E. coli*, el promotor P_L del fago lambda y otros promotores conocidos por controlar la expresión de genes en células procariotas (por ejemplo, los promotores tac, T3, T7 para *E. coli*) o eucariotas (por ejemplo, el promotor de citomegalovirus, el promotor tardío del adenovirus, el 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 apropiadas para amplificar la expresión. Por ejemplo, el vector puede contener potenciadores, que son secuencias de ADN estimulantes de la transcripción de origen viral, tales como los que derivan del virus simio tal como SV40, del virus de polioma, del citomegalovirus, del virus de papiloma bovino o del virus del sarcoma de Moloney, o de origen genómico. Preferentemente, el vector también contiene un origen de replicación. El vector se puede construir para que contenga un

origen de replicación exógeno o, dicho origen de replicación puede derivar de SV40 o de otra fuente viral, o mediante el mecanismo de replicación cromosómico en una célula huésped.

[0181] Además, los vectores contienen opcionalmente un gen marcador para la selección de células huésped transfectadas, tales como los genes del marcador de dihidrofolato reductasa que permiten una selección con metotrexato en una variedad de huéspedes, o antibióticos, tal como el gen de β-lactamasa (resistencia a ampicilina), el gen *Tet* (para resistencia a tetraciclina) usado en células procariotas o genes de resistencia a neomicina, GA418 (geneticina, un derivado de neomicina) gpt (ácido micofenólico), ampicilina o higromicina, o genes que complementan una lesión genética en las células huésped, tal como la ausencia de timidina quinasa, hipoxantina fosforibosiltransferasa, dihidrofolato reductasa, etc. Los genes que codifican el producto genético de los marcadores auxotróficos del huésped (por ejemplo, *LEU2, URA3, HIS3*) a menudo se usan como marcadores seleccionables en levadura.

[0182] Con el fin de obtener los anticuerpos de la presente invención, se debería incorporar una o más secuencias de polinucleótidos que codifican las regiones variables de las cadenas liviana y pesada y las regiones constantes de las cadenas liviana y pesada de los anticuerpos de la presente invención en un vector. Las secuencias de polinucleótidos que codifican las cadenas livianas y pesadas de los anticuerpos de la presente invención se pueden incorporar en uno o múltiples vectores y luego se pueden incorporar en las células huésped.

[0183] Los vectores de expresión adecuados para una 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 (división GIBCO de Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), pEF-Bos (Mizushima, S., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, *18*: 5322 (1990)), el retrovector bicistrónico GPEX® (Gala Biotech, Middleton, WI) y semejantes. Los vectores de expresión que son adecuados para su uso en diversos huéspedes de expresión, tales como células procariotas (*E. coli*), células de insecto (células Schnieder S2 de *Drosophila*, Sf9) y de levadura (*P. methanolica*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) también se encuentran disponibles. Los ejemplos de vectores son pLKTOK58 (secuencia de Fc IgG1 de tipo salvaje) y pLKTOK59 (secuencia de Fc IgG1 mutada) (véase la publicación de la Solicitud de Patente de los EE.UU. Nº. 20060147445).

[0184] Como se puede apreciar, los anticuerpos de acuerdo con la presente invención se pueden expresar en líneas celulares distintas de las líneas celulares de hibridomas. Se pueden usar las secuencias que codifican los clones de ADNc o genómicos para los anticuerpos particulares para células huésped de mamífero o no de mamífero adecuadas. La transformación se puede efectuar mediante cualquier método conocido para introducir polinucleótidos en una célula huésped, incluyendo, por ejemplo empaquetamiento del polinucleótido en un virus (o en un vector viral) y transducción de una célula huésped con el virus (o vector) o mediante procedimientos de transfección conocidos en el arte, para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero, por ejemplo, transfección mediada por dextrano, precipitación por fosfato de calcio, transfección mediada

por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, encapsulamiento de uno o más polinucleótidos en liposomas y microinyección directa de la molécula de ADN. El procedimiento de transformación usado depende del huésped a transformar. Los métodos para introducir polinucleótidos heterólogos en células de mamífero son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero en un sentido no limitativo, transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, bombardeo de partículas, encapsulamiento de uno o más polinucleótidos en liposomas, conjugados de péptidos, dendrímeros y microinyección directa del ADN en los núcleos.

[0185] En otro aspecto, la invención caracteriza una célula huésped que comprende un ácido nucleico descrito en la presente. En formas de realización, la célula expresa una molécula de anticuerpo, o un componente de la misma, descrita en la presente. Aún otra forma de realización provee un método para producir una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC descrita en la presente, por ejemplo una molécula de anticuerpo humana o humanizada que comprende mantener la célula huésped bajo condiciones apropiadas para su expresión, con lo cual se expresa una o más cadenas de inmunoglobulina y se produce una molécula de anticuerpo. Una forma de realización adicional provee una célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión anteriores que codifican secuencias de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo. La célula huésped 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, de *E. coli*. Por ejemplo, la célula de mamífero puede ser una célula o una línea celular

cultivada. Los ejemplos de células de mamífero incluyen líneas celulares linfocíticas (por ejemplo, NS0), células de ovario de ovario de hámster chino (CHO), células COS. En una forma de realización particular, la célula huésped cultivada es una célula COS que comprende las secuencias de ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo 5F9. En otra forma de realización, la célula huésped es el hibridoma 5F9 (PTA-8132). Otras células incluyen células de oocitos y células de un animal transgénico, por ejemplo, células del epitelio mamario. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que codifican una molécula de anticuerpo descrita en la presente se pueden expresar en un animal transgénico no humano.

[0186] Las líneas celulares de mamíferos disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidos en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de *American Type Culture Collection* (ATCC), incluyendo a modo de ejemplo células de ovario de hámster chino (CHO), células NSO, células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido (BHK), células de riñón de monocotiledóneas (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2) y diversas líneas celulares adicionales. También se pueden usar células que no son de mamífero, incluyendo pero en un sentido no limitativo células bacterianas, de levadura, de insecto y vegetales, para expresar los anticuerpos recombinantes. Puede ser preferible emplear una mutagénesis dirigida al sitio del dominio CH2 del anticuerpo para eliminar la glicosilación con el fin de impedir cambios en las funciones de inmunogenicidad, farmacocinéticas y/o efectoras debidas a una glicosilación no humana. Los métodos de expresión se seleccionan determinando el sistema que genera los mayores niveles de expresión y

produce anticuerpos con propiedades de unión a GCC constitutivas.

[0187] Aún otra forma de realización adicional provee un método para producir una molécula de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humana o humanizada, que comprenden mantener la célula huésped que comprende los ácidos nucleicos que se describen en la presente, por ejemplo, una o más de las secuencias de ácidos nucleicos enumeradas en la Tabla 4 ó 6, bajo condiciones apropiadas para la expresión de una inmunoglobulina, con 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 una variante de la misma. Por ejemplo, los métodos de expresión de moléculas de anticuerpo incluyen el uso de células huésped en donde una primera molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una cadena liviana del anticuerpo humano o humanizado, y una segunda molécula de ácido nucleico recombinante que codifica una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una cadena pesada del anticuerpo humano o humanizado, están comprendidas en un único vector de expresión. En otras formas de realización, se encuentran en vectores separados. El método puede comprender además el paso de aislar o recuperar el anticuerpo, fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo, una cadena de anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de una cadena de anticuerpo, si se deseara.

[0188] Por ejemplo, se puede introducir una molécula de ácido nucleico (es decir, una o más moléculas de ácidos nucleicos) que codifica las cadenas pesada y liviana 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 una o más moléculas de ácidos nucleicos, en una célula huésped adecuada para crear una célula huésped recombinante usando cualquier método apropiado para la célula huésped seleccionada (por ejemplo, transformación, transfección, electroporación, infección), de manera tal que la o las moléculas de ácidos nucleicos están ligadas 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, integrados en el genoma de la célula huésped). La célula huésped recombinante resultante se puede mantener bajo condiciones adecuadas para su expresión (por ejemplo, en la presencia de un inductor, en un animal no humano adecuado, en un medio de cultivo adecuado suplementado con sales apropiadas, factores de crecimiento, antibióticos, suplementos nutricionales, etc.), con lo cual se producen uno o más polipéptidos codificados. Si se deseara, se puede aislar o recuperar (por ejemplo, del animal, de la célula huésped, del medio, de la leche) la proteína codificada. Este proceso abarca la expresión en una célula huésped de un animal no humano transgénico (véase, por ejemplo, WO 92/03918, GenPharm International) o una planta transgénica.

[0189] Además, es posible aumentar la expresión de los anticuerpos de la invención (u otras porciones de los mismos) de líneas celulares productoras usando numerosas técnicas conocidas. Por ejemplo, los sistemas de expresión con genes de la glutamina sintetasa y DHFR constituyen enfoques comunes para mejorar la expresión bajo determinadas condiciones. Los clones celulares de gran expresión se pueden identificar usando técnicas convencionales, tal como clonación por dilución limitante, tecnología Microdrop o cualquier otro método conocido en el arte. El sistema GS se describe por completo o en

parte en las Patentes Europeas N°. 0 216 846, 0 256 055 y 0 323 997 y en la Solicitud de Patente Europea N°. 89303964.4.

[0190] En un ejemplo de sistema para la expresión recombinante de un anticuerpo modificado de la invención, o una porción de unión al antígeno del mismo, se introduce un vector de expresión recombinante que codifica la cadena pesada del anticuerpo y la cadena liviana del anticuerpo en células CHO dhfr^{-} a través de una transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de las cadenas pesada y liviana del anticuerpo están ligados, cada uno, a elementos reguladores potenciadores/promotores (por ejemplo, derivados del virus SV40, CMV, adenovirus y semejantes, tal como un elemento potenciador/promotor AdMLP del CMV o un elemento regulador potenciador/promotor AdMLP del SV40) para dirigir niveles elevados de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también contiene un gen DHFR, que permite seleccionar las células CHO dhfr^{-} transfectadas con el vector usando una selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformadas seleccionadas se cultivan de modo que se expresen las cadenas pesada y liviana del anticuerpo, y el anticuerpo intacto se aísla del medio de cultivo. Se usan técnicas convencionales de biología molecular para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las células huésped, seleccionar las transformantes, cultivar dichas células huésped y obtener el anticuerpo del medio de cultivo.

[0191] Los anticuerpos de la invención también se pueden producir transgénicamente por generación de un mamífero o de una planta que es transgénica para las secuencias de las cadenas pesada y liviana de

inmunoglobulina de interés y producción del anticuerpo en una forma recuperable a partir del mismo. Con relación a la producción transgénica en mamíferos, los anticuerpos se pueden producir en la leche de cabras, vacas u otros mamíferos y recuperar de la misma. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nº. 5.827.690, 5.756.687, 5.750.172 y 5. 741.957.

[0192] Los anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, cadenas de anticuerpo y porciones de unión al antígeno de los mismos que se describen en la presente también se pueden producir en un sistema de expresión *in vitro* adecuado, mediante síntesis química o mediante cualquier otro método adecuado.

Proteínas de fusión e inmunoconjugados

[0193] Los anticuerpos anti-GCC según se describió aquí pueden conectarse funcionalmente por cualquier método apropiado (por ejemplo, acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a una o más entidades moleculares que no son anticuerpos.

[0194] Se pueden producir proteínas de fusión en las cuales una molécula de anticuerpo anti-GCC según se describe aquí y una unidad que no es un anticuerpo son componentes de una única cadena de polipéptido continua. La unidad que no es un anticuerpo puede estar situada en una posición N-terminal, C-terminal, o interna, con respecto a la unidad de anticuerpo. Por ejemplo, algunas formas de realización se pueden producir por inserción de un ácido nucleico que codifica secuencias de inmunoglobulina en un vector de expresión apropiado, como por ejemplo un vector pET (por ejemplo, pET-15b, Novagen), un vector fago (por ejemplo, pCNATAB 5 E, Pharmacia), u otro vector, por ejemplo, vector de la proteína de fusión A pRIT2T, Pharmacia). La construcción que se obtiene como resultado se puede expresar para producir cadenas de anticuerpo que comprenden una unidad que no es un anticuerpo

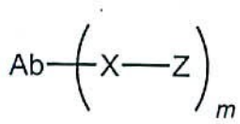
(por ejemplo, una marca Histidina, una marca E, o un dominio de unión de IgG una proteína A). Las proteínas de fusión se pueden aislar o recuperar usando cualquier técnica apropiada, como por ejemplo cromatografía usando una matriz de afinidad apropiada (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F. M. *et al.*, eds., Vol. 2, Supl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991)).

[0195] La invención provee moléculas de anticuerpos anti-GCC que se dirigen hacia células y que, en algunas formas de realización, se encuentran internalizados dentro de las mismas. Estos son capaces de suministrar agentes terapéuticos o agentes detectables a las células que expresan GCC o dentro de estas, pero no en células donde no se expresa el blanco o dentro de estas. Por lo tanto, la invención también provee inmunoconjugados anti-GCC que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC según se describe aquí, que está conjugada a un agente terapéutico o un agente detectable. En algunas formas de realización, la afinidad por GCC de un inmunoconjugado anti-GCC es de por lo menos 10, 25, 50, 75, 80, 90, o 95% de la del anticuerpo sin conjugar. Esto se puede determinar usando GCC de la superficie celular o GCC aislada. En una forma de realización las moléculas de anticuerpo anti-GCC, por ejemplo, un inmunoconjugado, tienen una LD50, determinada por un ensayo que se describe aquí, que es menor de 1.000, 500, 250, 100, o 50 pM.

[0196] Las moléculas de anticuerpo anti-GCC se pueden modificar para que actúen como inmunoconjugados utilizando técnicas conocidas en el arte. Véase por ejemplo, Vitetta *Immunol. Today* 14:252 (1993). Véase también la Patente de los EE.UU. No. 5.194.594. El preparado de anticuerpos radiomarcados también se puede preparar fácilmente utilizando técnicas conocidas en el arte. Véase por ejemplo, Junghans et al. En *Cancer Chemotherapy and Biotherapy* 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véase también las Patentes de los EE.UU. Nos.

4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (U.S. Re. Pat. No. 35.500), 5.648.471, y 5.697.902.

[0197] En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo y la unidad que no es un anticuerpo están conectadas por medio de un conector. En dichas formas de realización, el inmunoconjugado se puede representar por la fórmula (*I*):



(*I*)

donde,

Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC según se la describe aquí;

X es una unidad que conecta Ab y Z, por ejemplo, el residuo de un conector que se describe aquí luego de una unión covalente con uno de Ab y Z o ambos;

Z es un agente terapéutico o marcador; y

m varía dentro del rango entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15.

[0198] La variable *m* representa el número de unidades -X-Z por molécula de anticuerpo en un inmunoconjugado con la fórmula (*I*). En diversas formas de realización, *m* varía dentro del rango entre 1 y 15, entre 1 y 10, entre 1 y 9, entre 1 y 8, entre 1 y 7, entre 1 y 6, entre 1 y 5, entre 1 y 4, entre 1 y 3, ó entre 1 y 2. En algunas formas de realización, *m* varía dentro del rango entre 2 y 10, entre 2 y 9, entre 2 y 8, entre 2 y 7, entre 2 y 6, entre 2 y 5, entre 2 y 4 ó entre 2 y 3. En otras formas de realización, *m es* 1, 2, 3, 4, 5 ó 6. En las composiciones que comprenden una pluralidad de inmunoconjugados de la fórmula (*I*), *m* es el número promedio de unidades -X-Z por Ab, que también se denomina la carga promedio de droga. La carga promedio de droga puede variar dentro del rango

entre 1 y aproximadamente 15 unidades -X-Z por Ab. En algunas formas de realización, cuando *m* representa la carga promedio de droga, *m es* aproximadamente 1, aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, o aproximadamente 8. En algunas formas de realización indicativas, *m* es entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8. En una forma de realización, *m* es aproximadamente 8. En otra forma de realización, *m* es aproximadamente 4. En otra forma de realización, *m* es aproximadamente 2.

[0199] El número promedio de unidades -X-Z por Ab se puede caracterizar por medios convencionales tales como espectroscopía de masas, ensayo ELISA, y HPLC. También se puede determinar la distribución cuantitativa de los inmunoconjugados en términos de *m*. En algunos casos, la separación, purificación, y caracterización de inmunoconjugados homogéneos donde *m es* cierto valor, para diferenciarlos de inmunoconjugados con otras cargas de droga, se puede conseguir por medios tales como HPLC de fase inversa o electroforesis.

[0200] Los inmunoconjugados de la fórmula (*I*) pueden existir como mezclas, donde cada componente de la mezcla tiene un valor *m* diferente. Por ejemplo, un inmunoconjugado con la fórmula (*I*) puede existir como una mezcla de dos componentes inmunoconjugados separados: donde en un componente inmunoconjugado *m* es 7, y donde en el otro componente inmunoconjugado *m* es 8.

[0201] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 1, 2, y 3, respectivamente.

[0202] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 3, 4, y 5, respectivamente.

[0203] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 5, 6, y 7, respectivamente.

[0204] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 7, 8, y 9, respectivamente.

[0205] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 9, 10, y 11, respectivamente.

[0206] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 11, 12, y 13, respectivamente.

[0207] En una forma de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) existe como una mezcla de tres inmunoconjugados separados donde *m* para los tres inmunoconjugados separados es 13, 14, y 15, respectivamente.

[0208] Hay toda una gama de conectores apropiados (por ejemplo, reactivos heterobifuncionales para conectar una molécula de anticuerpo con un agente terapéutico o marcador) y métodos para preparar inmunoconjugados que son conocidos en el arte. (Véase, por ejemplo, Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992)). El conector puede ser clivable, por ejemplo, en condiciones fisiológicas, por ejemplo, en condiciones intracelulares, de tal manera que la separación del conector libera la droga (agente terapéutico o marcador) en el ambiente intracelular. En otras formas de realización, el conector no se puede clivar, y la droga se libera, por ejemplo, por degradación del anticuerpo.

[0209] El conector puede estar unido a un grupo químicamente reactivo sobre la unidad del anticuerpo, por ejemplo, a un grupo libre amino, imino, hidroxilo, tiol o carboxilo (por ejemplo, al extremo N- o C- terminal, al grupo amino epsilon

de uno o más residuos lisina, el grupo ácido carboxílico libre de uno o más residuos de ácido glutámico o ácido aspártico, o al grupo sulfhidrilo de uno o más residuos cisteinilo). El sitio al cual se une el conector puede ser un residuo natural en la secuencia de aminoácidos de la unidad de anticuerpo o se puede introducir en la unidad de anticuerpo, por ejemplo, por la tecnología de ADN recombinante (por ejemplo, introduciendo una cisteína o sitio de clivaje para una proteasa en la secuencia de aminoácidos) o by bioquímica de proteínas (por ejemplo, reducción, ajuste de pH o proteólisis).

[0210] Uno de los métodos no específicos que se utilizan más comúnmente para la unión covalente es la reacción de las carbodiimidas para unir a un grupo carboxi (o amino) de un compuesto con grupos amino (o carboxi) de las moléculas de anticuerpo. Adicionalmente, se han utilizado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir al grupo amino de un compuesto a los grupos amino de una molécula de anticuerpo. Para la unión de drogas a las moléculas de anticuerpo también se puede usar la reacción de la base de Schiff. Este método incluye la oxidación con peryodato de una droga que contiene grupos glicol o hidroxi, formando de esa manera un aldehído que luego se hace reaccionar con la molécula de anticuerpo. La unión ocurre por formación de una base de Schiff con los grupos amino de las moléculas de anticuerpo. También se pueden utilizar isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente drogas a las moléculas de anticuerpo. Los técnicos con experiencia conocen otras técnicas que se encuentran dentro del alcance de la presente invención.

[0211] En ciertas formas de realización, se hace reaccionar un intermediario, que es el precursor del conector (X), con la droga (Z) en las condiciones apropiadas. En ciertas formas de realización, se utilizan grupos reactivos en la droga y/o el intermediario. Subsiguientemente, el producto de la reacción entre la droga y el intermediario, o la droga derivatizada, se hace reaccionar con la molécula de anticuerpo en las condiciones apropiadas.

[0212] El inmunoconjugado se puede purificar separándolo de los reactivos empleando metodologías bien conocidas por aquellos con experiencia en el arte, por ejemplo, cromatografía en columna (por ejemplo, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de interacción hidrofóbica), diálisis, diafiltración o precipitación. El inmunoconjugado se puede evaluar empleando metodologías bien conocidas por aquellos con experiencia en el arte, por ejemplo, SDS-PAGE, espectroscopía de masas, o electroforesis capilar.

[0213] En algunas formas de realización, el conector se puede clivar mediante un agente clivante que está presente en el ambiente intracelular (*por ejemplo*, dentro de un lisosoma o endosoma o caveola). El conector puede ser, *por ejemplo*, un conector peptidilo que es clivado por una enzima intracelular peptidasa o proteasa, incluyendo, pero de manera no taxativa, una proteasa lisosómica o endosómica. En algunas formas de realización, el conector peptidilo consiste en por lo menos dos aminoácidos o por lo menos tres aminoácidos. Los agentes clivantes pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, de todas las cuales se sabe que hidrolizan derivados dipeptídicos de la droga para dar como resultado la liberación de droga activa en el interior de las células blanco (*véase*, *por ejemplo*, Dubowchik y Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Los más típicos son los conectores peptidilo que son clivados por enzimas presentes en las células que expresan GCC. Por ejemplo, se puede utilizar un conector peptidilo que se puede clivar mediante la proteasa catepsina-B dependiente de tiol, que está altamente expresada en el tejido canceroso (*por ejemplo*, un conector Phe-Leu o Gli-Phe-Leu-Gli (SEQ ID NO:319)). Otros ejemplos de conectores con dichas características se describen, *por ejemplo*, en la Patente de los EE.UU. No. 6.214.345, que se incorpora aquí como referencia en su totalidad y para todos los propósitos. En una forma de realización específico, el conector peptidilo clivable por una proteasa intracelular es un conector Val-Cit o un conector Phe-Lys (*véase, por*

ejemplo, la Patente de los EE.UU. 6.214.345, que describe la síntesis de doxorrubicina con el conector Val-Cit). Una ventaja del uso de la liberación intracelular del agente terapéutico proteolítico es que el agente típicamente se atenúa cuando al conjugarse y las estabilidades en suero de los conjugados son típicamente altas.

[0214] En otras formas de realización, el conector clivable es sensible al pH, *es decir*, sensible a la hidrólisis a ciertos valores de pH. Típicamente, el conector sensible al pH se puede hidrolizar en condiciones ácidas. Por ejemplo, se puede utilizar un conector lábil en medio ácido que se puede hidrolizar en el lisosoma (*por ejemplo*, una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal, u otro similar). (*Véanse*, por ejemplo, las Patentes de los EE.UU. Nos. 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). Los conectores con dichas características son relativamente estables en condiciones de pH neutro, como por ejemplo las de la sangre, pero son inestables por debajo de pH 5,5 ó 5,0, el pH aproximado del lisosoma. En ciertas formas de realización, el conector que se puede hidrolizar es un conector tioéter (tal como, *por ejemplo*, un tioéter unido al agente terapéutico a través de una unión acilhidrazona (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. No. 5.622.929).

[0215] En aún otras formas de realización, el conector se puede clivar en condiciones reductoras (*por ejemplo*, un conector disulfuro). una variedad de conectores disulfuro que son conocidos en el arte, que incluyen, por ejemplo, aquellos que se pueden formar usando SATA (S-acetiltioacetato de N-succinimidilo), SPDP (3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo), SPDB (3-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-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 EE.UU. No. 4.880.935.)

[0216] En aún otras formas de realización específicas, el conector es un conector malonato (Johnson *et al.*, 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), un conector maleimidobenzoilo (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg Med Chem.* 3(10):1299-1304), o un análogo 3'-N-amida (Lau *et al.*, 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

[0217] En aún otras formas de realización, la unidad conectora no se puede clivar y la droga se libera por degradación del anticuerpo. (Véase por ejemplo la Publicación de EE.UU. No. 20050238649 que se incorpora como referencia aquí en su totalidad y para todos los propósitos).

[0218] Típicamente, el conector no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular. Según se usa aquí, "no sustancialmente sensible al ambiente extracelular", en el contexto de un conector, significa que no más de aproximadamente 20%, típicamente no más de aproximadamente 15%, más típicamente no más de aproximadamente 10%, y aún más típicamente no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 3%, o no más de aproximadamente 1% de los conectores, en una muestra de inmunoconjugado, son clivados cuando el inmunoconjugado está presente en un ambiente extracelular (*por ejemplo*, en plasma). Se puede determinar si un conector no es sustancialmente sensible al ambiente extracelular, por ejemplo, incubando con plasma al inmunoconjugado durante un período de tiempo predeterminado (*por ejemplo*, 2, 4, 8, 16, ó 24 horas) y luego cuantificando la cantidad de droga libre presente en el plasma.

[0219] En otras formas de realización que no son mutuamente excluyentes, el conector promueve la internalización celular. En ciertas formas de realización, el conector promueve la internalización celular cuando está conjugado al agente terapéutico o marcador (Z). En aún otras formas de realización, el

conector promueve la internalización celular cuando está conjugado tanto a la unidad Z como a las moléculas de anticuerpo anti-GCC.

[0220] Una variedad de los conectores indicativos que se pueden utilizar con las composiciones y métodos de la presente se describen en WO 2004-010957, Publicación de EE.UU. No. 20060074008, Publicación de EE.UU. No. 20050238649, y Publicación de EE.UU. No. 20060024317 (cada una de las cuales se incorpora como referencia aquí en su totalidad y para todos los propósitos).

[0221] Los ejemplos de conectores que se pueden utilizar para acoplar una molécula de anticuerpo a un agente terapéutico o marcador incluyen, por ejemplo, maleimidocaproilo (mc); maleimidocaproil-*p*-aminobencilcarbamato; conectores maleimidocaproil-péptido-aminobencilcarbamato, por ejemplo, maleimidocaproil-L-fenilalanina-L-lisina-*p*-aminobencilcarbamato y maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-*p*-aminobencilcarbamato (vc); 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (también conocido como 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo o SPP); 4-succinimidil-oxicarbonil-2-metil-2-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT); 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP); 4-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo (SPDB); 2-iminotiolano; anhídrido S-acetilsuccínico; disulfuro bencil carbamato; carbonato; conectores hidrazona; éster de N-(α-Maleimidoacetoxi) succinimida; *N*-[4-(*p*-Azidosalicilamido) butil]-3′-(2′-piridilditio)propionamida (AMAS); éster de *N*-[□-Maleimidopropiloxi]succinimida (BMPS); éster de [N-ε-Maleimidocaproiloxi] succinimida (EMCS); éster de N-[γ-Maleimidobutiriloxi]succinimida (GMBS); 4-[N-Maleimidometil]ciclohexano-1-carboxi-[6-amidocaproato] de succinimidilo (LC-SMCC); 6-(3-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP); éster de *m*-Maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); [4-yodoacetil] aminobenzoato *de* *N*-Succinimidilo (SIAB); 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC); 3-[2-piridilditio]-propionamido de N-Succinimidilo (SPDP); éster de [N-ε-

Maleimidocaproiloxi]sulfosuccinimida (Sulfo-EMCS); éster N-[γ-Maleimidobutiriloxi] sulfosuccinimida (Sulfo-GMBS); 4-Sulfosuccinimidil-6-metil-α-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato) (Sulfo-LC-SMPT); 6-(3'-[2-piridilditio]-propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-LC-SPDP); éster de *m*-Maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-MBS); *N*-[4-yodoacetil] aminobenzoato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SIAB); 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de Sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMCC); 4-[*p*-maleimidofenil]butirato de sulfosuccinimidilo (Sulfo-SMPB); etilenglicol-bis(éster de N-hidroxisuccinimida y ácido succínico) (EGS); tartrato de disuccinimidilo (DST); ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA); ácido dietilentriamina-pentaacético (DTPA); y conectores tiourea.

[0222] En algunas formas de realización, el conector -X- tiene la fórmula $-A_a-W_w-Y_y-$, y el inmunoconjugado con la fórmula (*I*) se caracteriza por tener la fórmula (*II*):

$$Ab-\left(A_a-W_w-Y_y-Z\right)_m$$

(*II*)

donde,

Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC según se la describe aquí;

-A- es una unidad extensora;

a es 0 ó 1;

cada -W- es independientemente una unidad aminoácido;

w es un entero dentro del rango entre 0 y 12;

-Y- es una unidad espaciadora autofragmentante;

y es 0, 1, ó 2;

Z es un agente terapéutico o marcador; y

m varía dentro del rango entre aproximadamente 1 y aproximadamente 15.

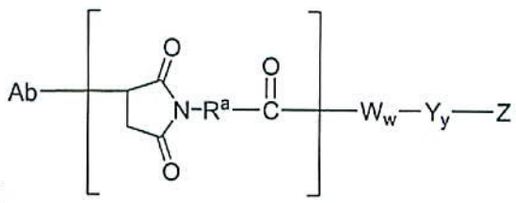
[0223] La unidad extensora (A), cuando está presente, es capaz de conectar a una unidad Ab con una unidad aminoácido (-W-), si está presente, con una unidad espaciadora (-Y-), si está presente; o con un agente terapéutico o marcador (Z). Los grupos funcionales útiles que pueden estar presentes en una molécula de anticuerpo anti-GCC, ya sea naturalmente o por manipulación química incluyen, pero de manera no taxativa, sulfhidrilo, amino, hidroxilo, el grupo hidroxilo anomérico de un carbohidrato, y carboxilo. Los grupos funcionales apropiados son sulfhidrilo y amino. En un ejemplo, se pueden generar grupos sulfhidrilo por reducción de las uniones disulfuro intramoleculares de una molécula de anticuerpo anti-GCC. En otra forma de realización, los grupos sulfhidrilo se pueden generar por reacción de un grupo amino de una unidad lisina de una molécula de anticuerpo anti-GCC con 2-iminotiolano (reactivo de Traut) u otros reactivos generadores de sulfhidrilo. En ciertas formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo recombinante y se la diseña para que posea uno o más lisinas. En algunas otras formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC recombinante se diseña para que tenga grupos sulfhidrilo adicionales, *por ejemplo*, cisteínas adicionales.

[0224] En una forma de realización, la unidad extensora forma una unión con un átomo de azufre de la unidad Ab. El átomo de azufre puede provenir de un grupo sulfhidrilo de un Ab. Las unidades extensoras representativas de esta forma de realización se muestran dentro de los corchetes de las fórmulas (***IIIa***) y (***IIIb***), donde Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son según se definieron anteriormente, y R^a se selecciona entre -C_1-C_{10} alquileno-, -C_2-C_{10} alquenileno-, -C_2-C_{10} alquinileno-, -carbociclo-, -O-(C_1-C_8 alquileno)-, O-(C_2-C_8 alquenileno)-, -O-(C_2-C_8 alquinileno)-, -arileno-, -C_1-C_{10} alquileno-arileno-, -C_2-C_{10} alquenileno-arileno, -C_2-C_{10} alquinileno-arileno, -arileno-C_1-C_{10} alquileno-, -arileno-C_2-C_{10}

alquenileno-, -arileno-C_2-C_{10} alquinileno-, -C_1-C_{10} alquileno-(carbociclo)-, -C_2-C_{10} alquenileno-(carbociclo)-, -C_2-C_{10} alquinileno-(carbociclo)-, -(carbociclo)-C_1-C_{10} alquileno-, -(carbociclo)-C_2-C_{10} alquenileno-, -(carbociclo)-C_2-C_{10} alquinileno, heterociclo-, -C_1-C_{10} alquileno-(heterociclo)-, -C_2-C_{10} alquenileno-(heterociclo)-, -C_2-C_{10} alquinileno-(heterociclo)-, -(heterociclo)-C_1-C_{10} alquileno-, -(heterociclo)-C_2-C_{10} alquenileno-, -(heterociclo)-C_2-C_{10} alquinileno-, -$(CH_2CH_2O)_r$-, o -$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-, y r es un entero dentro del rango entre 1-10, donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, heterociclo, y arileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos. En algunas formas de realización, dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, heterociclo, y arileno, ya sea solos o como parte de otro grupo, no están sustituidos. En algunas formas de realización, R^a se selecciona entre -C_1-C_{10} alquileno-, - carbociclo-, -O-(C_1-C_8 alquileno)-, -arileno-, -C_1-C_{10} alquileno-arileno-, -arileno-C_1-C_{10} alquileno-, -C_1-C_{10} alquileno-(carbociclo)-, -(carbociclo)-C_1-C_{10} alquileno-, -C_3-C_8 heterociclo-, -C_1-C_{10} alquileno-(heterociclo)-, -(heterociclo)-C_1-C_{10} alquileno-, -$(CH_2CH_2O)_r$-, y -$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-; y r es un entero dentro del rango entre 1-10, donde dichos grupos alquileno no están sustituidos y el resto de los grupos opcionalmente pueden estar sustituidos.

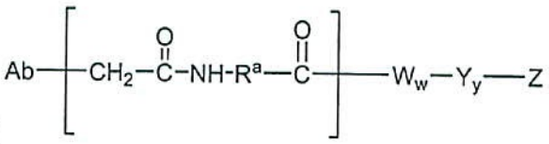
[0225] De todas las formas de realización indicativas se debe entender que aún donde no se denote expresamente, pueden haber entre 1 y 15 unidades de la droga conectadas a un Ab (*m* = 1-15).

[0226]



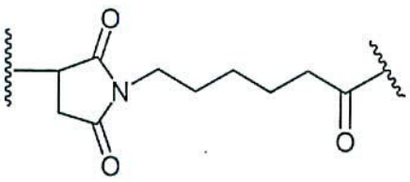
(*IIIa*)

[0227]

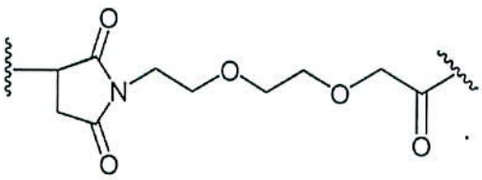


(*IIIb*)

[0228] Una unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula (***IIIa***) donde R^a es -$(CH_2)_5$-:

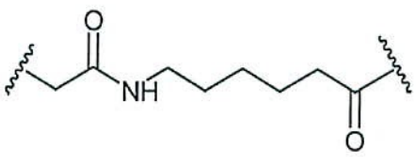


[0229] Otra unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula (***IIIa***) donde R^a es -$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-; y r es 2:

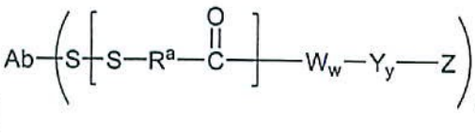


[0230] Otra unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula (***IIIa***) donde R^a es -arileno- o arileno-C_1-C_{10} alquileno-. En algunas formas de realización, el grupo arilo es un grupo fenilo no sustituido.

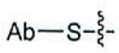
[0231] Aún otra unidad extensora ilustrativa es la de la fórmula (***IIIb***) donde R^a es -$(CH_2)_5$-:



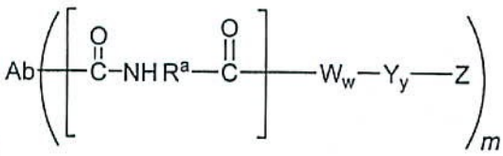
[0232] En ciertas formas de realización, la unidad extensora está conectada a la unidad Ab a través de una unión disulfuro entre un átomo de azufre de la unidad Ab y un átomo de azufre de la unidad extensora. Una unidad extensora representativa de esta forma de realización se muestra dentro de los corchetes de la fórmula (***IV***), donde R^a, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son según se definieron anteriormente.

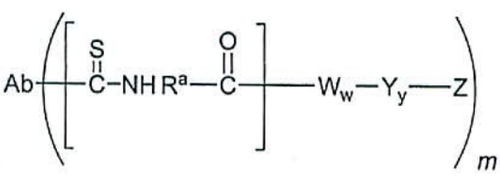
[0233]  (*IV*)

[0234] Se debe hacer notar que durante toda esta solicitud, la unidad S en la siguiente fórmula se refiere a un átomo de azufre de la unidad Ab, a no ser que el contexto indique otra cosa.



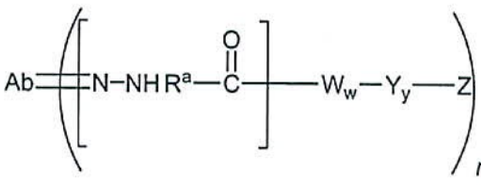
[0235] En aún otras formas de realización, el Extensor, antes de unirse a Ab, contiene un sitio reactivo que puede formar una unión con un grupo amino primario o secundario del Ab. Los ejemplos de dichos sitios reactivos incluyen, pero de manera no taxativa, ésteres activados tales como ésteres de succinimida, 4-nitrofenil ésteres, pentafluorofenil ésteres, tetrafluorofenil ésteres, anhídridos, cloruros de ácido, cloruros de sulfonilo, isocianatos e isotiocianatos. Se muestran unidades extensoras representativas de esta forma de realización dentro de los corchetes de las fórmulas (***Va***) y (***Vb***), donde -R^a-, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son según se definieron anteriormente;

[0236]  (*Va*)

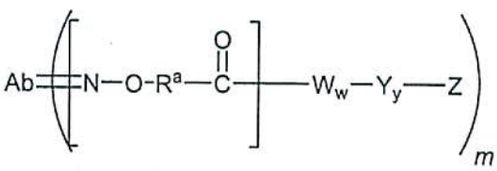
[0237]  (*Vb*)

[0238] En algunas formas de realización, el Extensor contiene un sitio reactivo que es reactivo a un grupo de un carbohidrato modificado (-CHO) que puede estar presente en un Ab. Por ejemplo, se puede oxidar suavemente un carbohidrato usando un reactivo tal como peryodato de sodio y la unidad que se obtiene como resultado (-CHO) del carbohidrato oxidado se puede

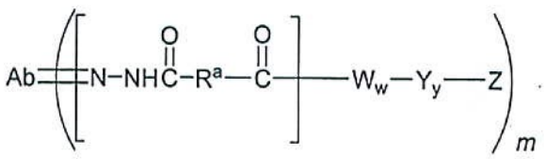
condensar con un Extensor que contiene una funcionalidad tal como una hidrazida, una oxima, una amina primaria o secundaria, una hidrazina, una tiosemicarbazona, un carboxilato de hidrazina, y una arilhidrazida tal como aquellas descritas por Kaneko *et al.*, 1991, *Bioconjugated Chem.* 2:133-41. Las unidades extensoras representativas de esta forma de realización se muestran dentro de los corchetes de las fórmulas (***VIa***), (***VIb***), y (***VIc***), donde -R^a-, Ab-, -W-, -Y-, -Z, w e y son según se definieron anteriormente.



(***VIa***)



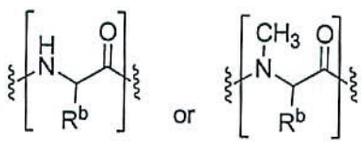
(***VIb***)



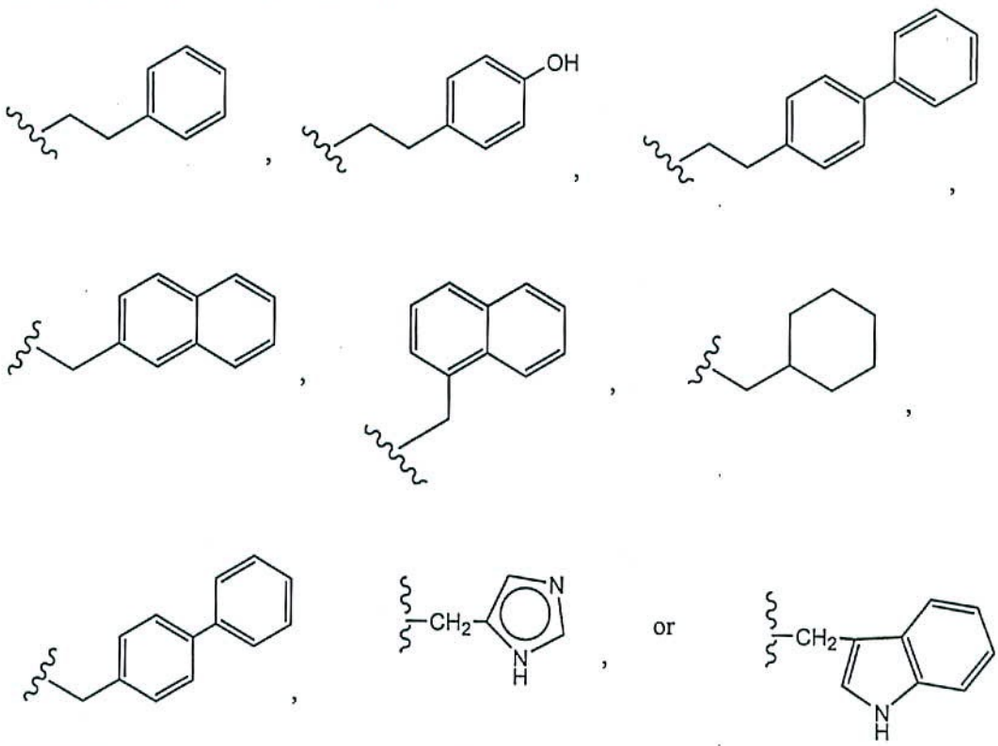
(***VIc***)

[0239] La unidad aminoácido (-W-), cuando está presente, conecta a la unidad extensora con la unidad espaciadora si la unidad espaciadora está presente, conecta a la unidad extensora con la droga unidad si la unidad espaciadora está ausente, y conecta a la unidad Ab con el agente terapéutico o la unidad marcadora si están ausentes la unidad extensora y la unidad espaciadora.

W_w- puede ser, por ejemplo, una unidad monopéptido, dipéptido, tripéptido, tetrapéptido, pentapéptido, hexapéptido, heptapéptido, octapéptido, nonapéptido, decapéptido, undecapéptido o dodecapéptido. Cada unidad -W- tiene independientemente la fórmula que se denota a continuación entre corchetes, y w es un entero dentro del rango entre 0 y 12:



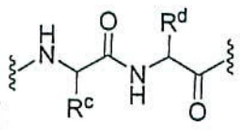
donde $R^{b\ es}$ hidrógeno, metilo, isopropilo, isobutilo, *sec*-butilo, bencilo, *p*-hidroxibencilo, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-piridilmetil-, 3-piridilmetil-, 4-piridilmetil-, fenilo, ciclohexilo,



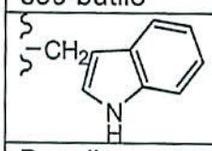
[0240] En algunas formas de realización, la unidad aminoácido puede ser clivada enzimáticamente por una o más enzimas, que incluyen una proteasa asociada al cáncer o a un tumor, para liberar el agente terapéutico o la unidad

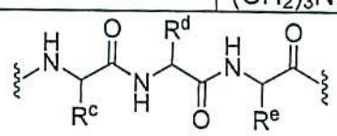
marcadora (-Z), que en una forma de realización se protona *in vivo* al ser liberada para dar un agente terapéutico o marcador (Z).

[0241] En ciertas formas de realización, la unidad aminoácido puede comprender aminoácidos naturales. En otras formas de realización, la unidad aminoácido puede comprender aminoácidos no naturales. Las unidades W_w ilustrativa se representan con las fórmulas (***VII***)-(***IX***):

[0242]  (***VII***)

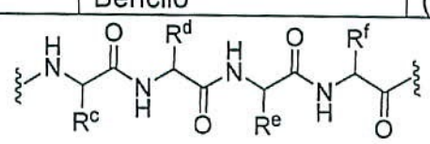
donde R^c y R^d son según se estipula a continuación:

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	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$;

 (***VIII***)

donde R^c, R^d y R^e son según se estipula a continuación:

R^c	**R^d**	**R^e**
Bencilo	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;
Isopropilo	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2$; y
H	Bencilo	$(CH_2)_4NH_2$;

 (***IX***)

donde R^c, R^d, R^e y R^f son según se estipula a continuación:

R^c	R^d	R^e	R^f
H	Bencilo	Isobutilo	H; y
Metilo	isobutilo	Metilo	isobutilo.

[0243] Las unidades aminoácido indicativas incluyen, pero de manera no taxativa, unidades de la fórmula (***VII***) donde: R^c es bencilo y R^d es $-(CH_2)_4NH_2$; R^c es isopropilo y R^d es $-(CH_2)_4NH_2$; o R^c es isopropilo y R^d es $-(CH_2)_3NHCONH_2$. Otra unidad aminoácido indicativa es una unidad con la fórmula (***VIII***) donde R^c es bencilo, R^d es bencilo, y R^e es $-(CH_2)_4NH_2$.

[0244] Las unidades $-W_w-$ útiles se pueden diseñar y se puede optimizar su selectividad para el clivaje enzimático por una enzima en particular, por ejemplo, una proteasa asociada un tumor. En una forma de realización, una unidad $-W_w-$ es una cuyo clivaje es catalizado por la catepsina B, C y D, o una plasmina proteasa.

[0245] En una forma de realización, $-W_w-$ es un dipéptido, tripéptido, tetrapéptido o pentapéptido. Cuando R^b, R^c, R^d, R^e o R^f es diferente de hidrógeno, el átomo de carbono al cual R^b, R^c, R^d, R^e o R^f está unido es quiral.

[0246] Cada átomo de carbono al cual R^b, R^c, R^d, R^e o R^f está unido puede tener independientemente la configuración (S) o (R).

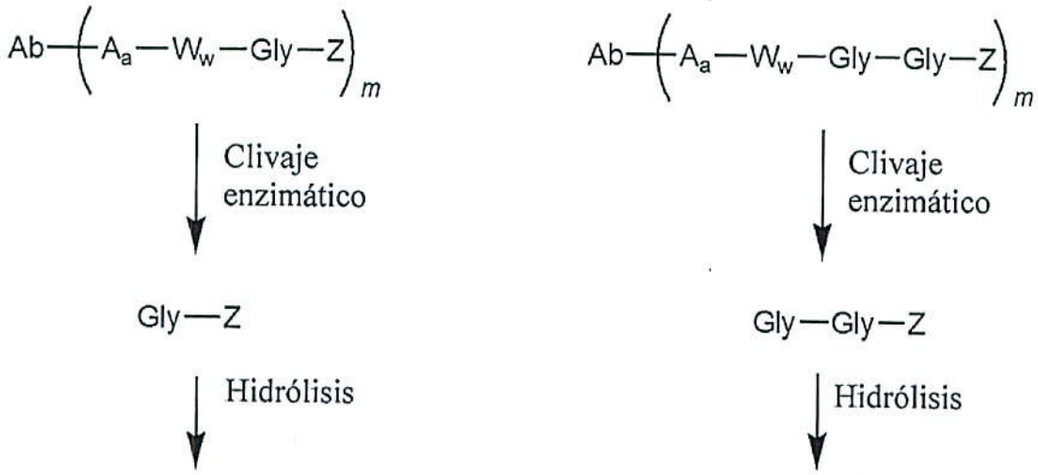
[0247] En un aspecto de la unidad aminoácido, la unidad aminoácido es valina-citrulina (vc o val-cit). En otro aspecto, la unidad aminoácido es fenilalanina-lisina (es decir, fk). En aún otro aspecto de la unidad aminoácido, la unidad aminoácido es N-metilvalina-citrulina. En aún otro aspecto, la unidad aminoácido es ácido 5-aminovalérico, homo fenilalanina lisina, tetraisoquinolinacarboxilato lisina, ciclohexilalanina lisina, ácido isonepecótico lisina, beta-alanina lisina, glicina serina valina glutamina y ácido isonepecótico.

[0248] Cuando está presente, la unidad espaciadora (-Y-), conecta a una unidad aminoácido con el agente terapéutico o la unidad marcadora (-Z-) cuando hay presente una unidad aminoácido. Como alternativa, la unidad

espaciadora conecta a la unidad extensora con el agente terapéutico o la unidad marcadora cuando la unidad aminoácido está ausente. La unidad espaciadora también conecta al agente terapéutico o a la unidad marcadora con la unidad Ab cuando están ausentes tanto la unidad aminoácido como la unidad extensora.

[0249] Las unidades espaciadoras pertenecen a dos tipos generales: no autofragmentante o autofragmentante. Una unidad espaciadora no autofragmentante es una en la cual parte de la unidad espaciadora o toda ella sigue unida al agente terapéutico o a la unidad marcadora luego del clivaje, en particular enzimático, de una unidad aminoácido del conjugado anticuerpo-droga. Los ejemplos de una unidad espaciadora no autofragmentante incluyen, pero de manera no taxativa una unidad espaciadora (glicina-glicina) y una unidad espaciadora glicina (ambas se muestran en el **Esquema 1**) (más adelante). Cuando un conjugado que contiene una unidad espaciadora glicina-glicina o una unidad espaciadora glicina es sometido a clivaje enzimático por una enzima (*por ejemplo*, una proteasa a asociada células tumorales, una proteasa asociada una células cancerosas o una proteasa asociada a linfocitos), se cliva una unidad glicina-glicina-Z o una unidad glicina-Z de Ab-Aa-Ww-. En una forma de realización, dentro de la célula blanco sucede una reacción de hidrólisis independiente, que cliva la unión de la unidad glicina-Z y libera al agente terapéutico o al marcador.

Esquema 1



[0250] En algunas formas de realización, una unidad espaciadora no autofragmentante (-Y-) es -Gli-. En algunas formas de realización, una unidad espaciadora no autofragmentante (-Y-) es -Gli-Gli-.

[0251] En una forma de realización, la invención provee un inmunoconjugado con la fórmula (II) donde la unidad espaciadora está ausente (y = 0), o una sal del mismo aceptable para uso farmacéutico.

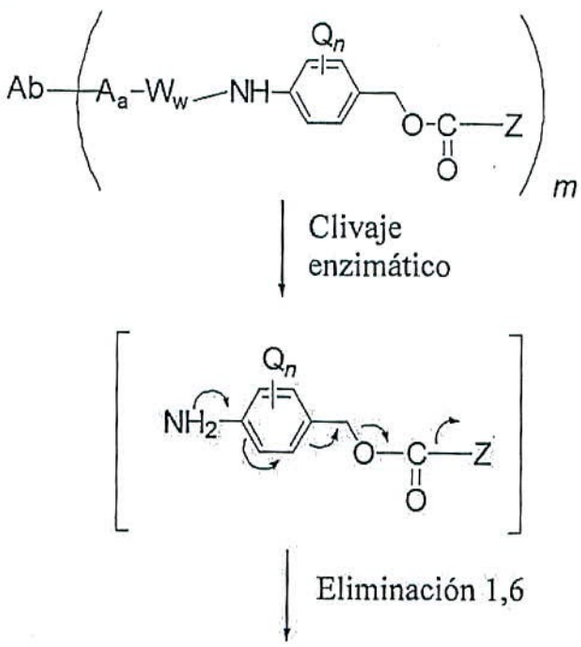
[0252] Como alternativa, un conjugado que contiene una unidad espaciadora autofragmentante puede liberar -Z. Según se usa aquí, el término "espaciador autofragmentante" se refiere a una unidad química bifuncional que es capaz de conectar covalentemente entre sí a dos unidades químicas separadas por un espaciador para dar una molécula tripartita estable. Esta se separará espontáneamente de la segunda unidad química al clivarse su unión con la primera unidad.

[0253] En algunas formas de realización, $-Y_y-$ es una unidad de alcohol p-aminobencílico (PAB) (véanse los Esquemas **2** y **3**) cuya porción fenileno está sustituida con Q_n donde Q es $-C_1-C_8$ alquilo, $-C_2-C_8$ alquenilo, $-C_2-C_8$ alquinilo, $-O-(C_1-C_8$ alquilo), $-O-(C_2-C_8$ alquenilo), $-O-(C_2-C_8$ alquinilo), -halógeno,-nitro o -ciano; y *n* es un entero dentro del rango entre 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo

y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos.

[0254] En algunas formas de realización, -Y- es un grupo PAB que está conectada a $-W_w-$ a través del átomo de nitrógeno del amino del grupo PAB, y conectada directamente a -Z a través de un grupo carbonato, carbamato o éter. Sin las limitaciones presentadas por ninguna teoría o mecanismo en particular, el Esquema 2 muestra un posible mecanismo de liberación de un agente terapéutico o marcador (-Z) desde un grupo PAB que está unido directamente a -Z a través de un grupo carbamato o carbonato según lo describen Toki *et al.*, 2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872.

Esquema 2



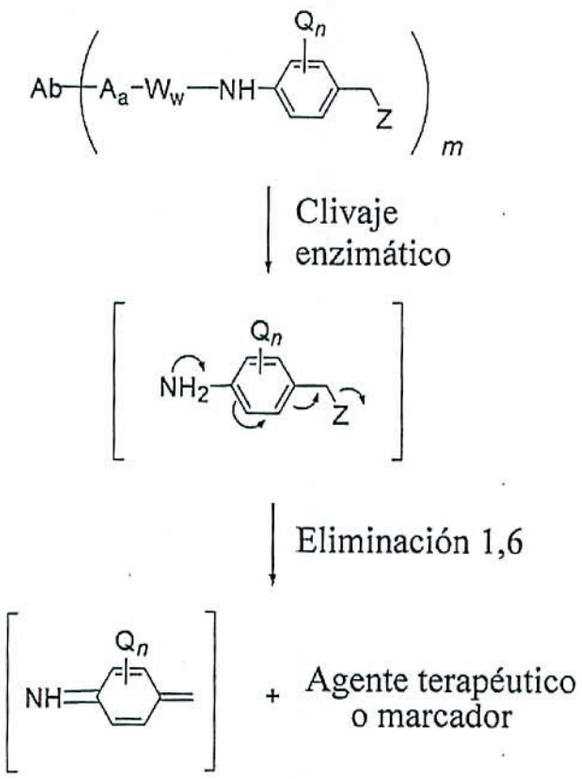
Agente terapéutico o marcador

[0255] En el Esquema **2**, Q es $-C_1$-C_8 alquilo, $-C_2$-C_8 alquenilo, $-C_2$-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -halógeno, -nitro o -ciano; *m* es un entero dentro del rango entre 0-4; y *m* varía dentro del rango

entre 1 y aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos.

[0256] Sin las limitaciones presentadas por ninguna teoría o mecanismo en particular, el Esquema **3** muestra un posible mecanismo de liberación de un agente terapéutico o unidad marcadora (-Z) desde un grupo PAB que está unido directamente a -Z a través de una conexión éter o amina, donde -Z incluye al grupo oxígeno o nitrógeno que es parte del agente terapéutico o la unidad marcadora.

Esquema 3

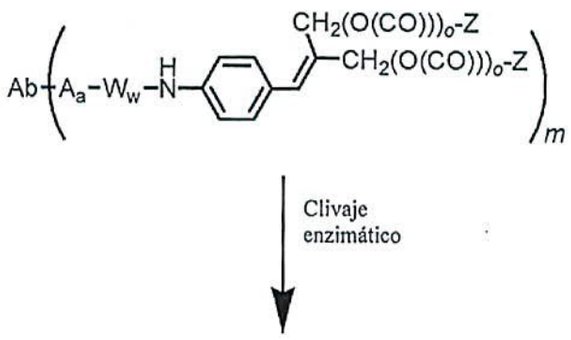


[0257] En el Esquema **3**, Q es -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -halógeno, -nitro o -ciano; *n* es un entero dentro del rango entre 0-4; y *m* varía dentro del rango entre 1 y aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos.

[0258] Otros ejemplos de espaciadores autofragmentantes incluyen, pero de manera no taxativa, compuestos aromático cuya configuración electrónica es similar a la del grupo PAB tales como derivados 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay *et al.*, 1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) y orto o para-aminobencilacetales. Se pueden utilizar espaciadores que sufren ciclización al suceder la hidrólisis de la unión amida, como por ejemplo amidas del ácido 4-aminobutírico sustituidas y no sustituidas (Rodrigues *et al.*, 1995, *Chemistry Biology* 2:223), sistemas de anillos biciclo[2.2.1] y biciclo[2.2.2] sustituidos apropiadamente (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). Las drogas que contienen aminas que están sustituidas en la posición α de la glicina (Kingsbury *et al.*, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447) que sufren la eliminación también son ejemplos de espaciadores autofragmentantes.

[0259] En una forma de realización, la unidad espaciadora es una unidad bis(hidroximetil)-estireno (BHMS) ramificada tal como se muestra en el Esquema **4**, que se puede utilizar para incorporar y liberar múltiples drogas.

Esquema 4



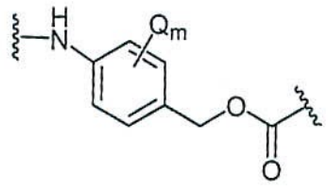
(2 x m) agentes terapéuticos o marcadores

[0260] En el Esquema **4**, Q es -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -halógeno, -nitro o -ciano; *n* es un entero dentro del rango entre 0-4; *o* es 0 ó 1; y *m es* un entero

entre 1 y aproximadamente 20. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos.

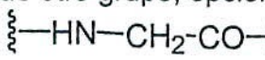
[0261] En algunas formas de realización, las unidades -Z son la misma. En aún otra forma de realización, las unidades -Z son diferentes.

[0262] En un aspecto, las unidades espaciadoras ($-Y_y-$) están representadas por las Fórmulas (**X**)-(**XII**):



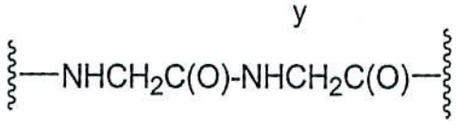
(***X***)

donde Q es $-C_1$-C_8 alquilo, $-C_2$-C_8 alquenilo, $-C_2$-C_8 alquinilo, -O-(C_1-C_8 alquilo), -O-(C_2-C_8 alquenilo), -O-(C_2-C_8 alquinilo), -halógeno, -nitro o -ciano; y *m* es un entero dentro del rango entre 0-4. Los grupos alquilo, alquenilo y alquinilo, ya sea solos o como parte de otro grupo, opcionalmente pueden estar sustituidos.



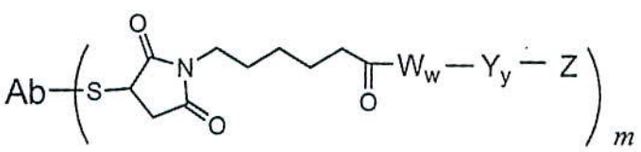
(***XI***)

y

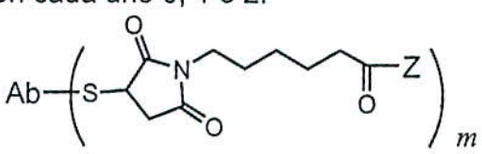


(***XII***)

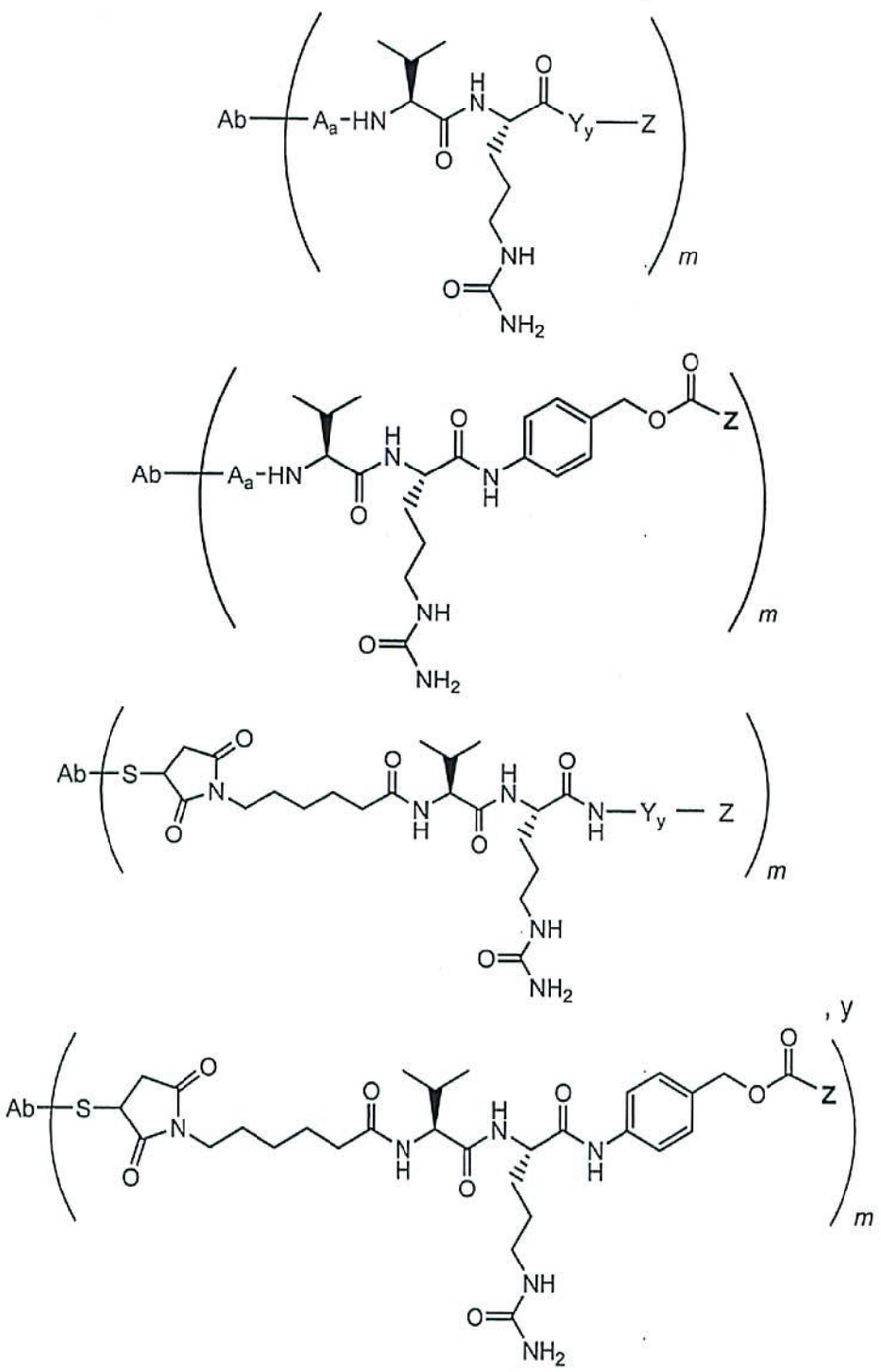
[0263] En un grupo de formas de realización seleccionadas, los conjugados de la fórmula (***I***) y (***II***) son:



donde w e y son cada uno 0, 1 ó 2:



donde w e y son cada uno 0;



donde A_a, W_w, Y_y, Z y Ab tienen los significados que se acaban de definir.

[0264] La variable Z en la fórmula (*I*) es un agente terapéutico o marcador. El agente terapéutico puede ser cualquier agente capaz de ejercer un efecto biológico que se desea. En algunas formas de realización, el agente terapéutico sensibiliza a la célula a una segunda modalidad terapéutica, por ejemplo, a un agente quimioterapéutico, una terapia con radiación, inmunoterapia.

[0265] En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un agente citostático o citotóxico. Los ejemplos incluyen, sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, azatioprina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fludarabina, pentostatin, cladribina, 5-fluorouracilo (5FU), floxuridina (FUDR), citosina arabinósido (citarabina), metotrexato, trimetoprim, pirimetamina, pemetrexed); agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, uramustin, melfalán, clorambucilo, tiotepa/clorambucilo, ifosfamida, carmustina, lomustina, estreptozocina, busulfán, dibromomanitol, cisplatino, carboplatino, nedaplatino, oxaliplatino, satraplatino, triplatino tetranitrato, procarbazina, altretamina, dacarbazina, mitozolomida, temozolomida); antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina, doxorrubicina, epirrubicina, idarrubicina, valrrubicina); antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina, antramicina, estreptozotocina, gramicidina D, mitomicinas (por ejemplo, mitomicina C), duocarmicinas (por ejemplo, CC-1065), calicheamicinas); agentes antimitóticos (que incluyen, por ejemplo, maytansinoides, auristatinas, dolastatinas, criptoficinas, alcaloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina, vinorelbina), taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel, o un taxano novedoso (véase, por ejemplo, Publicación de Patente Internacional No. WO 01/38318, publicada el 30 de mayo, 2001)), y colchicinas; inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, tenipósido, mitoxantrona); y inhibidores de proteasoma (por ejemplo, ácidos peptidil borónicos).

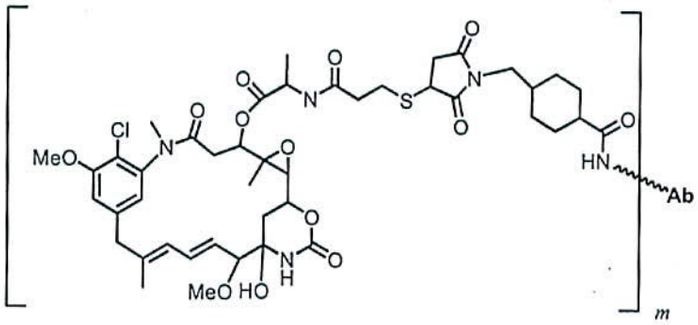
Inmunoconjugados de Maytansinoide

[0266] En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un maytansinoide. Los compuestos maytansinoide y los métodos para su conjugación con 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 Patentes de los EE.UU. Nos. 5.208.020 y 6.333.410. Los ejemplos de maytansinoides incluyen análogos de maytansina con un anillo aromático modificado (por ejemplo, C-19-descloro, C-20-desmetoxi, C-20-aciloxi) y aquellos con 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 formas de realización, el maytansinoide es $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(4-mercapto-1-oxopentil)maytansina (DM3), $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(3-mercapto-1-oxopropil)maytansina (DM1), o $N^{2'}$-desacetil-$N^{2'}$-(4-mercapto-4-metil-1-oxopentil)maytansina (DM4).

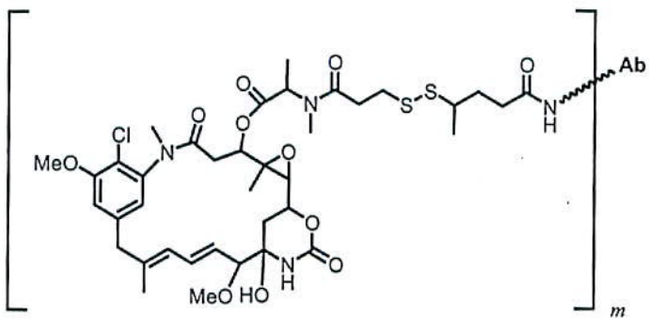
[0267] Los compuestos maytansinoide que comprenden un grupo sulfhidrilo se pueden acoplar con los anticuerpos usando un conector heterobifuncional que se conecta al compuesto maytansinoide por medio de una unión puente tioéter o disulfuro. En algunas de dichas formas de realización, el conector se acopla a un grupo amino en el anticuerpo (por ejemplo, un grupo amino terminal o el grupo amino epsilon de un residuo lisina. En algunas formas de realización, el conector heterobifuncional que se utiliza para acoplar compuestos maytansinoide a un anticuerpo es 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (también conocido como 4-(2-piridilditio)pentanoato de N-succinimidilo, o SPP), 4-succinimidil-oxicarbonil-2-metil-2-(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de N-succinimidilo (SMCC), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP); 4-(2-piridilditio)butirato de N-succinimidilo (SPDB), 2-iminotiolano, o anhídrido S-acetilsuccínico.

[0268] En ciertas formas de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (***I***) está caracterizado 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***), donde Ab es una

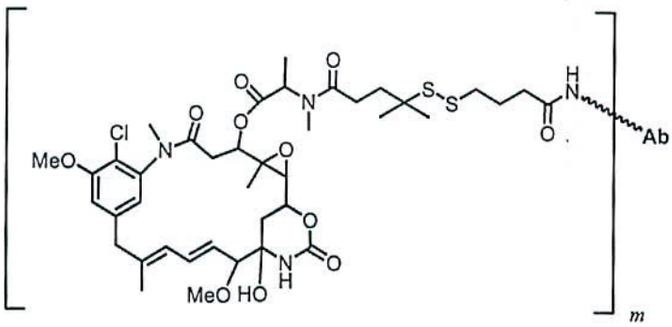
molécula de anticuerpo anti-GCC según se describe aquí, y *m* tiene los valores y valores preferidos descritos anteriormente para la fórmula (*I*).



(*I-1*)



(*I-2*)



(*I-3*)

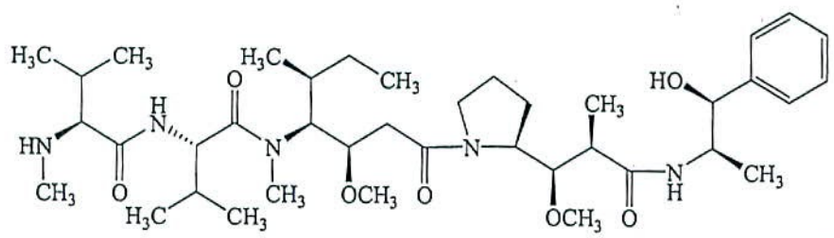
[0269] En algunas formas de realización, la variable Ab en la fórmula (***I-1***), (***I-2***), o (***I-3***) es una molécula de anticuerpo con las características que se resumen en las tablas 1 a 6. En ciertas formas de realización, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 o una molécula de anticuerpo Abx-229.

[0270] En algunas formas de realización, la variable *m* en la fórmula (***I-1***), (***I-2***), o (***I-3***) varía dentro del rango entre aproximadamente 1 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 3 y aproximadamente 7, o entre aproximadamente 3 y aproximadamente 5.

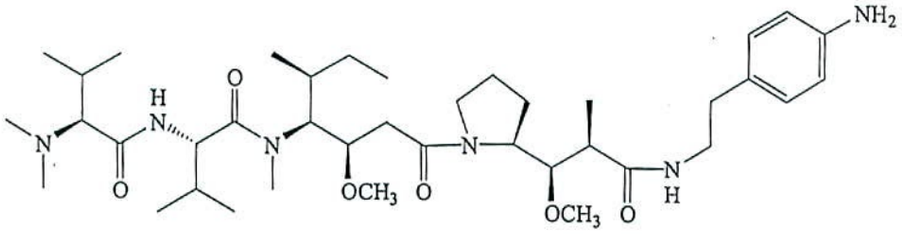
[0271] En ciertas formas de realización en particular, la invención se refiere a un inmunoconjugado con la fórmula (***I-1***), (***I-2***), o (***I-3***), donde Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 y *m* es aproximadamente 4.

Inmunoconjugados de dolastatina y auristatina

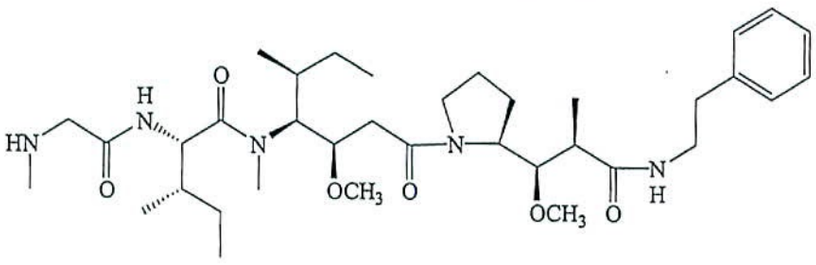
[0272] En algunas otras formas de realización, el agente terapéutico es una dolastatina. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es una auristatina, como por ejemplo auristatina E (que en el arte también se conocen como derivados de dolastatina-10) o un derivado de los mismas. En algunas formas de realización, el agente terapéutico es un compuesto que se selecciona entre compuestos de la Fórmulas (***XIII***)-(***XXIII***), o una forma de sal de los mismos aceptable para uso farmacéutico:



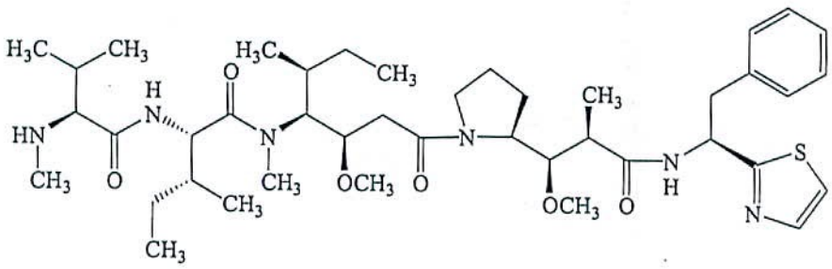
(***XIII***)



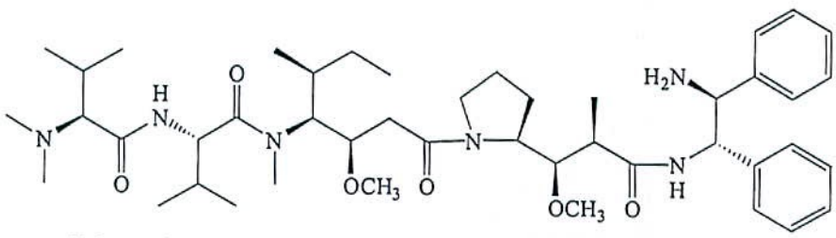
(***XIV***)



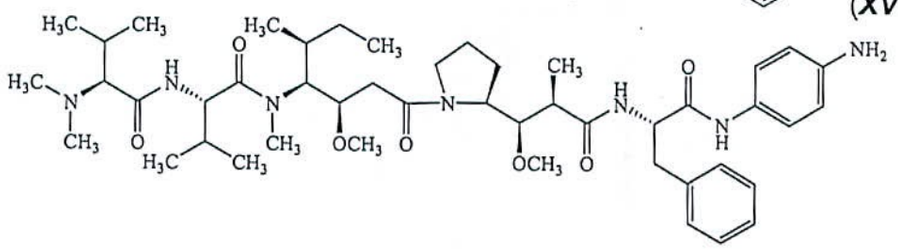
(***XV***)



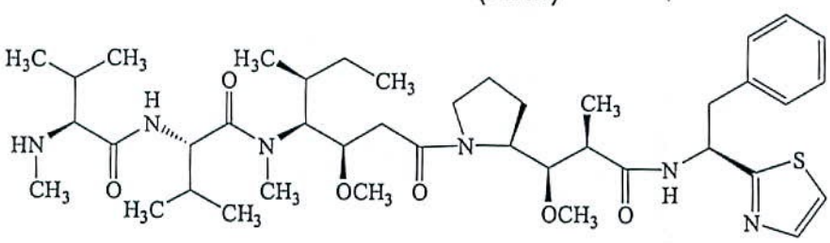
(*XVI*)



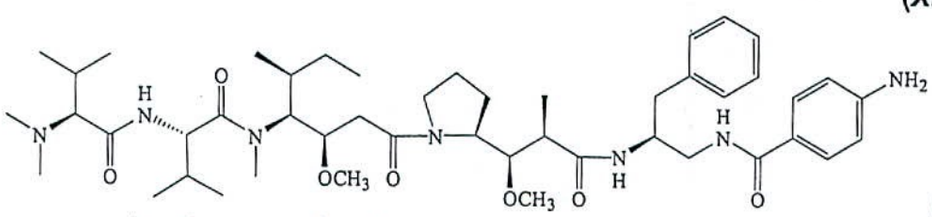
(*XVII*)



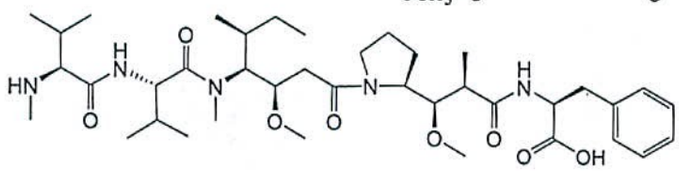
(*XVIII*)



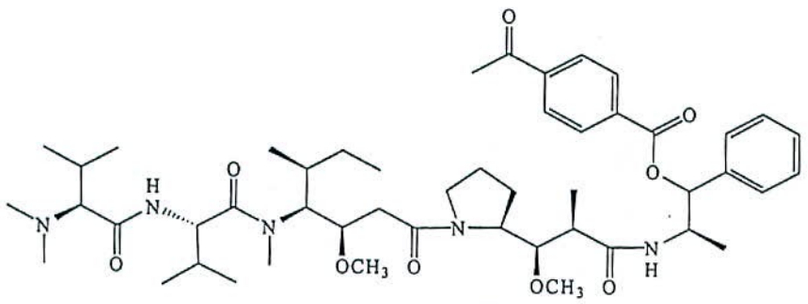
(*XIX*)



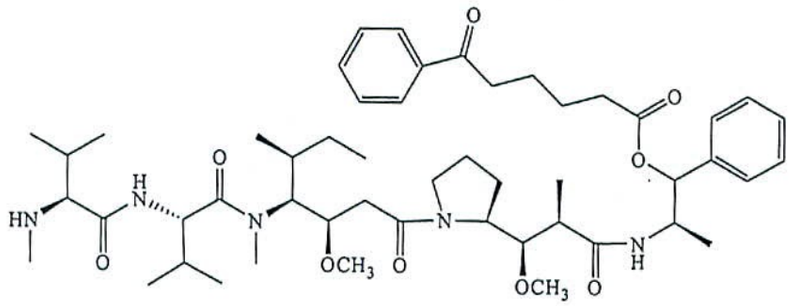
(*XX*)



(*XXI*)



(*XXII*)



(*XXIII*)

[0273] Los compuestos auristatina y los métodos para su conjugación con 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); Patentes de los EE.UU. Nos. 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; Patente de los EE.UU. Publicación Nos. 20090010945, 20060074008, 20080300192, 20050009751, 20050238649, y 20030083236; y Publicaciones de Patentes Internacionales Nos. WO 04/010957 y WO 02/088172, cada una de las cuales se incorpora como referencia aquí en su totalidad y para todos los propósitos.

[0274] La auristatina puede ser, por ejemplo, un éster formado entre auristatina E y un ceto ácido. Por ejemplo, la auristatina E se puede hacer reaccionar con ácido paraacetil benzoico o ácido benzoilvalérico para dar AEB y AEVB, respectivamente. Otras auristatinas típicas incluyen auristatina fenilalanina

fenilendiamina (AFP; (***XVIII***)), monometil auristatina E (MMAE; (***XIII***)), y monometil auristatina F (MMAF; (***XXI***)).

[0275] Se ha mostrado que las auristatinas interfieren con la dinámica de los microtúbulos y la división nuclear y celular y poseen actividad anticancerosa. Las auristatinas para utilizar en la presente invención se unen a la tubulina y pueden ejercer un efecto citotóxico o citostático sobre las líneas de células que expresan GCC. Los métodos para determinar si es que un compuesto se une a la tubulina son conocidos en el arte. Véanse, 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. Para los propósitos de la presente invención, se puede determinar la afinidad relativa de un compuesto por la tubulina. Algunas auristatinas preferidas de la presente invención se unen a la tubulina con una afinidad dentro del rango entre 10 veces menor (afinidad más débil) que la afinidad de unión de MMAE con tubulina de 10 veces, 20 veces o aún 100 veces mayor (mayor afinidad) que la afinidad de unión de MMAE con tubulina.

[0276] Existen varios ensayos diferentes, conocidos en el arte, que se pueden utilizar para determinar si es que una auristatina o el inmunoconjugado resultante ejerce un efecto citostático o citotóxico sobre una línea de células deseada. Por ejemplo, La actividad citotóxica o citostática de un inmunoconjugado se puede medir de la siguiente manera: exponer células de mamífero que expresan una proteína blanco del inmunoconjugado en un medio de cultivo para células; cultivar las células durante un período de entre aproximadamente 6 horas y aproximadamente 5 días; y medir la viabilidad de las células. Se pueden utilizar ensayos *in vitro* basados en células para medir la viabilidad (proliferación), citotoxicidad, e inducción de la apoptosis (activación de caspasa) del inmunoconjugado.

[0277] Para determinar si es que un inmunoconjugado ejerce un efecto citostático, se puede utilizar un ensayo de incorporación de timidina. Por

ejemplo, se pueden cultivar células cancerosas que expresan un antígeno blanco con una densidad de 5.000 células/cavidad de una placa de 96 cavidades durante un período de 72 horas y se pueden exponer a 0,5 µCi de ^{3}H-timidina durante las últimas 8 horas del período de 72 horas. La incorporación de ^{3}H-timidina dentro de células del cultivo se mide en presencia y ausencia del inmunoconjugado.

[0278] Para determinar la citotoxicidad, se puede medir la necrosis o apoptosis (muerte celular programada). La necrosis típicamente es acompañada por un aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática; hinchamiento de la célula, y ruptura de la membrana plasmática. La apoptosis típicamente se caracteriza por globulación de la membrana, condensación del citoplasma, y la activación de endonucleasas endógenas. La determinación de cualquiera de dichos efectos en células cancerosas indica que un inmunoconjugado es que son útiles en el tratamiento de ciertos tipos de cáncer.

[0279] La viabilidad celular se puede medir determinando en una célula la absorción de una tintura tal como rojo neutro, azul tripán, o azul ALAMAR™ (*véase, por ejemplo*, Page *et al.*, 1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476). En un ensayo con dichas características, las células se incuban en medios que contienen la tintura, las células se lavan, y la tintura que queda, que refleja la absorción celular de la tintura, se mide por espectrofotometría. Para medir la citotoxicidad también se puede utilizar la tintura que se une a proteínas sulforodamina B (SRB) (Skehan *et al.*, 1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12).

[0280] Como alternativa, se utiliza una sal de tetrazolio, como por ejemplo MTT o WST, en un ensayo colorimétrico cuantitativo de sobrevivencia y proliferación células de mamífero por detección de las células vivas, sin detectar las muertas, (*véase, por ejemplo*, Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63).

[0281] La apoptosis se puede cuantificar midiendo, por ejemplo, la fragmentación del ADN. Se pueden obtener métodos fotométricos comercial para la determinación cuantitativa *in vitro* de la fragmentación del ADN. En

Biochemica, 1999, no. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals) se describen ejemplos de dichos ensayos, que incluyen TUNEL (que detecta la incorporación de nucleótidos marcados en el ADN fragmentado) y ensayos basados en ELISA.

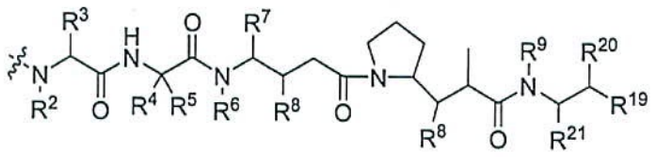
[0282] La apoptosis también se puede determinar midiendo cambios morfológicos en una célula. Por ejemplo, al igual que con la necrosis, se puede determinar la pérdida de integridad de la membrana plasmática midiendo la absorción de ciertas tinturas (*por ejemplo*, una tintura fluorescente tal como, por ejemplo, naranja de acridina o bromuro de etidio). Un método para medir el número de células apoptóticas ha sido descrito por Duke y Cohen, *Current Protocols in Immunology* (Coligan *et al.* eds., 1992, pp. 3.17.1-3.17.16). También se pueden marcar las células con una tintura para ADN (*por ejemplo*, naranja de acridina, bromuro de etidio, o yoduro de propidio) y se puede observar en las células la condensación y marginación de cromatina a lo largo de la membrana nuclear interior. Otros cambios morfológicos que se pueden medir para determinar la apoptosis incluyen, *por ejemplo*, condensación citoplasmática, aumento de globulación de la membrana, y contracción celular.

[0283] La presencia de células apoptóticas se puede medir en los compartimientos de los cultivos tanto unidos como "flotantes". Por ejemplo, ambos compartimientos se pueden recolectar eliminando el sobrenadante, tratando con tripsina a las células unidas, combinando a los preparados luego de un paso de lavado con centrifugación (*por ejemplo*, 10 minutos a 2000 rpm), y detectando la apoptosis (*por ejemplo*, midiendo la fragmentación del ADN). (*Véase*, *por ejemplo*, Piazza *et al.*, 1995, *Cancer Research* 55:3110-16).

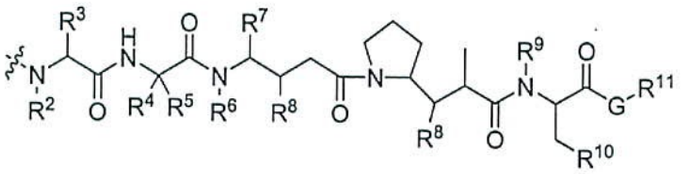
[0284] Los efectos de los inmunoconjugados se pueden probar o validar en modelos animales. Existen varios modelos animales establecidos de los tipos de cáncer que son conocidos por los técnicos con experiencia, cualquiera de los cuales se puede utilizar para analizar la eficacia de un inmunoconjugado. Los ejemplos no taxativos de dichos modelos se describen *más adelante*.

Además, se pueden crear modelos en pequeños animales para analizar las eficacias *in vivo* de los inmunoconjugados implantando líneas de células de tumor humano en cepas apropiadas de roedores inmunodeficientes, *por ejemplo*, ratones desnudos atímicos o ratones SCID.

[0285] En algunas realizaciones, la variable -Z en fórmula (*I*) es una porción auristatina de fórmula (***X-A***) o fórmula (***X-B***):



(***X-A***)



(***X-B***)

donde, independientemente en cada ubicación:

la línea ondulada indica una unión;

R^2 es -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo;

R^3 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, carbociclo, -C_1-C_{20} alquileno (carbociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(carbociclo), -C_2-C_{20} alquinilen(carbociclo), -arilo, -C_1-C_{20} alquilen(arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(arilo), -C_2-C_{20} alquinilen(arilo), -heterociclo, -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo);

R^4 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, carbociclo, -C_1-C_{20} alquileno (carbociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(carbociclo), -C_2-C_{20} alquinilen(carbociclo), -arilo, -C_1-C_{20} alquilen(arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(arilo), -

C_2-C_{20} alquinilen(arilo), -heterociclo, -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo);

R^5 es -H o -C_1-C_8 alquilo;

o R^4 y R^5 juntos forman un anillo carbocíclico y tienen la fórmula -$(CR^aR^b)_s$- donde R^a y R^b son independientemente -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, o –carbociclo y s es 2, 3, 4, 5 o 6,

R^6 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo;

R^7 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, -carbociclo, -C_1-C_{20} alquileno (carbociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(carbociclo), -C_2-C_{20} alquinilen(carbociclo), -arilo, -C_1-C_{20} alquilen(arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(arilo), -C_2-C_{20} alquinilen(arilo), heterociclo, -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo);

cada R^8 es independientemente -H, -OH, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, -O-(C_1-C_{20} alquilo), -O-(C_2-C_{20} alquenilo), -O-(C_1-C_{20} alquinilo), o -carbociclo;

R^9 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo;

R^{19} es -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;

R^{20} es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, -carbociclo, -O-(C_1-C_{20} alquilo), -O-(C_2-C_{20} alquenilo), -O-(C_2-C_{20} alquinilo), o OR^{18} donde R^{18} es -H, un grupo protector de hidroxilo, o una unión directa donde OR^{18} representa =O;

R^{21} es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo, -arilo, -heterociclo, o -carbociclo;

R^{10} es -arilo o -heterociclo;

G es –O-, -S-, -NH-, o -NR^{12}-, donde $\mathbf{R^{12}}$ es -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo;

$\mathbf{R^{11}}$ es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, -arilo, -heterociclo, $-(R^{13}O)_s-R^{14}$, o $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$;

s es un entero en el rango de 0-1000;

$\mathbf{R^{13}}$ es -C_2-C_{20} alquileno, -C_2-C_{20} alquenileno, o -C_2-C_{20} alquinileno;

$\mathbf{R^{14}}$ es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo;

cada aparición de $\mathbf{R^{15}}$ es independientemente -H, -COOH, $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$, $-(CH_2)_t-SO_3H$, $-(CH_2)_t-SO_3-C_1-C_{20}$ alquilo, $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ alquenilo, o $-(CH_2)_t-SO_3-C_2-C_{20}$ alquinilo;

cada aparición de $\mathbf{R^{16}}$ es independientemente -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo o $-(CH_2)_t-COOH$; y

t es un entero en el rango de 0 a 6; donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo, tanto solos como parte de otro grupo, están opcionalmente sustituidos.

[0286] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

[0287] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde los grupos de R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, y R^9 no están sustituidos y los grupos de R^{19}, R^{20} y R^{21} están opcionalmente sustituidos como se describe aquí.

[0288] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde

$\mathbf{R^2}$ es -C_1-C_8 alquilo;

R^3, R^4 y R^7 se seleccionan independientemente entre -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, C_3-C_6 carbociclo monocíclico, -C_1-C_{20} alquilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_{20} alquenilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_{20} alquinilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_6-C_{10} arilo, -C_1-C_{20} alquilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_{20} alquinilen(C_6-C_{10} arilo), -heterociclo, -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo); donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, carbociclo, arilo, y heterociclo están opcionalmente sustituidos;

R^5 es -hidrógeno;

R^6 es -C_1-C_8 alquilo;

cada R^8 se selecciona independientemente entre -OH, -O-(C_1-C_{20} alquilo), -O-(C_2-C_{20} alquenilo), o -O-(C_2-C_{20} alquinilo) donde dicho alquilo, alquenilo, y alquinilo radicales están opcionalmente sustituidos;

R^9 es -hidrógeno o -C_1-C_8 alquilo;

R^{19} se sustituye opcionalmente fenilo;

R^{20} es OR^{18}; donde R^{18} es H, un grupo protector de hidroxilo, o una unión directa donde OR^{18} representa =O;

R^{21} se selecciona entre -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, o -carbociclo; donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, y carbociclo están opcionalmente sustituidos; o una sal aceptable farmacéuticamente de los mismos.

[0289] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo;

R^3 es -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, o -C_2-C_8 alquinilo, donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

R^4 es -H, -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo, -C_2-C_8 alquinilo, C_3-C_6 carbociclo monocíclico, -C_6-C_{10} arilo, -C_1-C_8 alquilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_8 alquenilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_8 alquinilen(C_6-C_{10} arilo), -C_1-C_8 alquileno (C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_8 alquenileno (C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_8 alquinilen(carbociclo C_3-C_6 monocíclico); donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, y carbociclo tanto solos como parte de otro grupo están opcionalmente sustituidos;

R^5 es H; R^6 es metilo;

R^7 es -C_1-C_8 alquilo, -C_2-C_8 alquenilo o -C_2-C_8 alquinilo;

cada R^8 es metoxi;

R^9 es -hidrógeno o -C_1-C_8 alquilo;

R^{19} es fenilo;

R^{20} es OR^{18}; donde R^{18} es -H, un grupo protector de hidroxilo, o una unión directa donde OR^{18} representa =O;

R^{21} es metilo; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0290] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es metilo; R^7 es isopropilo o sec-butilo; R^8 es metoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo; R^{19} es fenilo; R^{20} es OR^{18}; donde R^{18} es H, un grupo protector de hidroxilo, o una unión directa donde OR^{18} representa =O; y R^{21} es metilo; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0291] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo o C_1-C_3 alquilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es C_1-C_3 alquilo; R^7 es C_1-C_5 alquilo; R^8 es C_1-C_3 alcoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo; R^{19} es fenilo; R^{20} es OR^{18}; donde R^{18} es H, un grupo protector de hidroxilo, o una unión directa donde OR^{18} representa =O; y R^{21} es C_1-C_3 alquilo; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0292] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo;

R^3, R^4, y R^7 se seleccionan independientemente entre -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, C_3-C_6 carbociclo monocíclico, -C_1-C_{20} alquilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_{20} alquenilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_2-C_{20} alquinilen(C_3-C_6 carbociclo monocíclico), -C_6-C_{10} arilo, -C_1-C_{20} alquilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_{20} alquenilen(C_6-C_{10} arilo), -C_2-C_{20} alquinilen(C_6-C_{10} arilo), -heterociclo, -C_1-C_{20} alquilen(heterociclo), -C_2-C_{20} alquenilen(heterociclo), o -C_2-C_{20} alquinilen(heterociclo); dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, carbociclo, arilo, y heterocíclico tanto solos como parte de otro grupo están opcionalmente sustituidos;

R^5 es -H;

R^6 es metilo;

cada R^8 es metoxi;

R^9 es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo; donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

R^{10} es arilo opcionalmente sustituido o heterociclo opcionalmente sustituido;

G es –O-, -S-, -NH-, o -NR^{12}-, donde $\mathbf{R^{12}}$ es -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente;

$\mathbf{R^{11}}$ es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo, -arilo, -heterociclo, -$(R^{13}O)_s$-R^{14}, o -$(R^{13}O)_s$-$CH(R^{15})_2$, donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, arilo, y heterociclo están opcionalmente sustituidos;

s es un entero en el rango de 0-1000;

$\mathbf{R^{13}}$ es -C_2-C_{20} alquileno, -C_2-C_{20} alquenileno, o -C_2-C_{20} alquinileno, cada uno de los cuales se sustituye opcionalmente;

$\mathbf{R^{14}}$ es -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, o -C_2-C_{20} alquinilo donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

cada aparición de $\mathbf{R^{15}}$ es independientemente -H, -COOH, –$(CH_2)_t$-$N(R^{16})_2$, –$(CH_2)_t$-SO_3H, –$(CH_2)_t$-SO_3-C_1-C_{20} alquilo, –$(CH_2)_t$-SO_3-C_2-C_{20} alquenilo, o –$(CH_2)_t$-SO_3-C_2-C_{20} alquinilo donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

cada aparición de $\mathbf{R^{16}}$ es independientemente -H, -C_1-C_{20} alquilo, -C_2-C_{20} alquenilo, -C_2-C_{20} alquinilo o –$(CH_2)_t$-COOH donde dichos radicales alquilo, alquenilo y alquinilo están opcionalmente sustituidos;

t es un entero en el rango de 0 a 6; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0293] En algunas de estas realizaciones, R^{10} es fenilo opcionalmente sustituido;

[0294] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde los grupos de R^2, R^3, R^4, R^5, R^6, R^7, R^8, y R^9 no están sustituidos y los grupos de R^{10} y R^{11} son como se describe aquí.

[0295] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde dichos radicales alquilo, alquenilo, alquinilo, alquileno, alquenileno, alquinileno, arilo, carbociclo, y heterociclo no están sustituidos.

[0296] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde

R^2 es C_1-C_3 alquilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es C_1-C_3 alquilo; R^7 es C_1-C_5 alquilo; R^8 es C_1-C_3 alcoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo;

R^{10} es fenilo opcionalmente sustituido; **G** es O, S, o NH; y R^{11} es como se define aquí; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0297] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es metilo; R^7 es isopropilo o sec-butilo; R^8 es metoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo;

R^{10} es fenilo opcionalmente sustituido; **G** es O, S, o NH; y R^{11} es como se define aquí; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0298] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde

R^2 es metilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es metilo; R^7 es isopropilo o sec-butilo; R^8 es metoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo; R^{10} es fenilo; y **G** es O o NH y R^{11} es como se define aquí, preferentemente hidrógeno; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0299] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde

R^2 es C_1-C_3 alquilo; R^3 es H o C_1-C_3 alquilo; R^4 es C_1-C_5 alquilo; R^5 es H; R^6 es C_1-C_3 alquilo; R^7 es C_1-C_5 alquilo; R^8 es C_1-C_3 alcoxi; R^9 es hidrógeno o C_1-C_8 alquilo;

R^{10} es fenilo; y **G** es O o NH y R^{11} es como se define aquí, preferentemente hidrógeno; o una forma salina aceptable farmacéuticamente del mismo.

[0300] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) o (***X-B***) incluyen aquellas donde R^3, R^4 y R^7 son independientemente isopropilo o sec-butilo y R^5 es -H. En una forma de realización ejemplar, R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^5 es H, y R^7 es sec-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0301] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) o (***X-B***) incluyen aquellas donde R^2 y R^6 son cada uno metilo, y R^9 es H. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0302] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) o (***X-B***) incluyen aquellas donde cada aparición de R^8 es $-OCH_3$. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0303] Las auristatinas de fórmula (***X-A***) o (***X-B***) incluyen aquellas donde R^3 y R^4 son cada uno isopropilo, R^2 y R^6 son cada uno metilo, R^5 es H, R^7 es sec-butilo, cada aparición de R^8 es $-OCH_3$, y R^9 es H. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0304] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde **G** es -O- o -NH-. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0305] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde R^{10} es arilo. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0306] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde R^{10} es -fenilo. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

[0307] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde **G** es -O-, y R^{11} es H, metilo o t-butilo. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

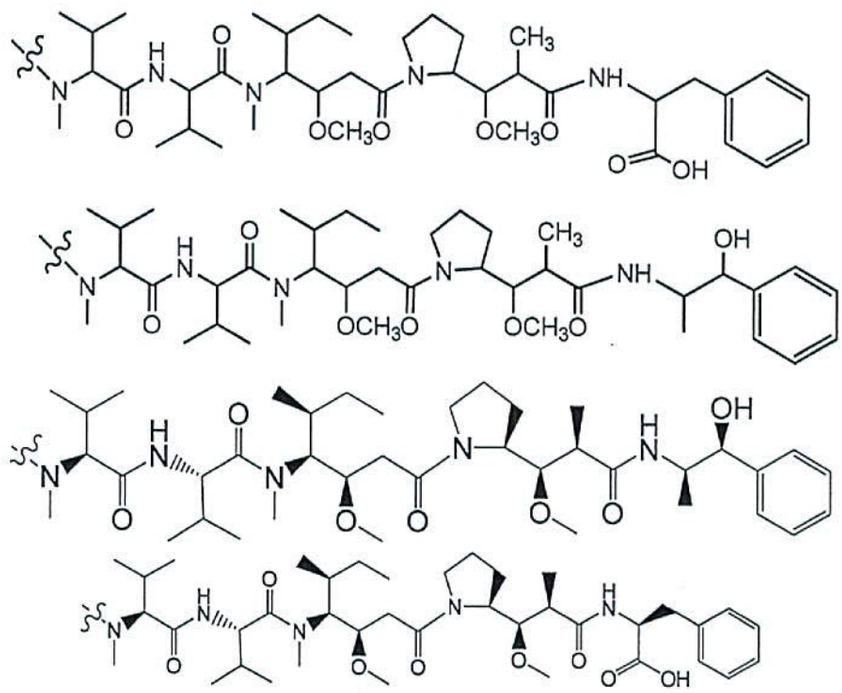
[0308] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde, cuando **G** es -NH, R^{11} es $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es $-(CH_2)_t-N(R^{16})_2$, y R^{16} es $-C_1-C_8$ alquilo o $-(CH_2)_t-COOH$. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

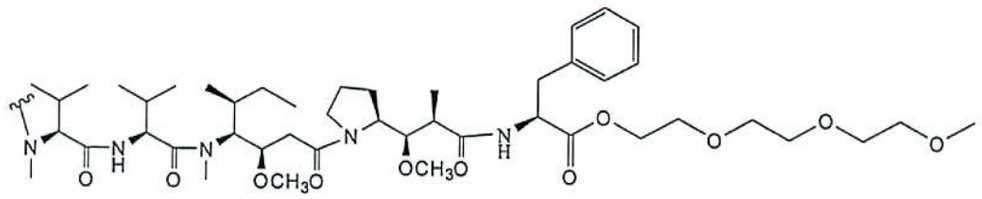
[0309] Las auristatinas de fórmula (***X-B***) incluyen aquellas donde cuando **G** es -NH, R^{11} es $-(R^{13}O)_s-CH(R^{15})_2$, donde R^{15} es H o $-(CH_2)_t-SO_3H$. El resto de los sustituyentes son como se definen aquí.

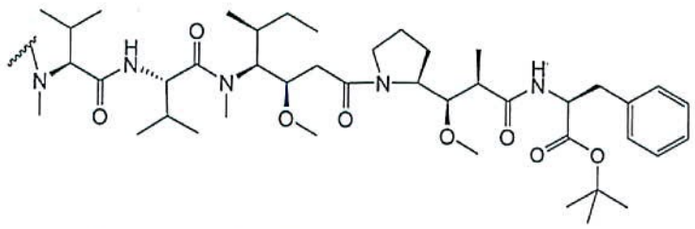
[0310] En formas de realización preferidas de los inmunoconjugados de fórmula (***II***), cuando **Z** es una molécula de auristatina de fórmula (***X-A***), w es un entero en el rango de 1 a 12, preferentemente 2 a 12, y es 1 o 2, y a es preferentemente 1.

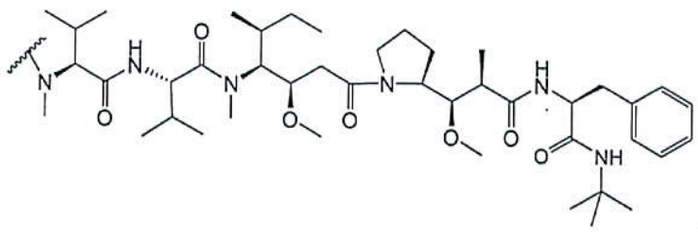
[0311] En algunas realizaciones de los inmunoconjugados de fórmula (***II***), cuando **Z** es una molécula de auristatina de fórmula (***X-B***), a es 1 y w e y son 0.

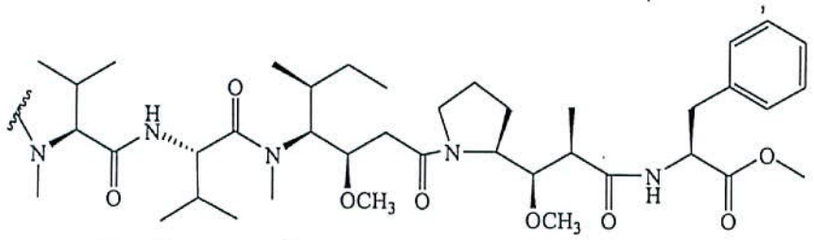
[0312] Los agentes terapéuticos (-**Z**) ilustrativos incluyen a aquellos con las siguientes estructuras:

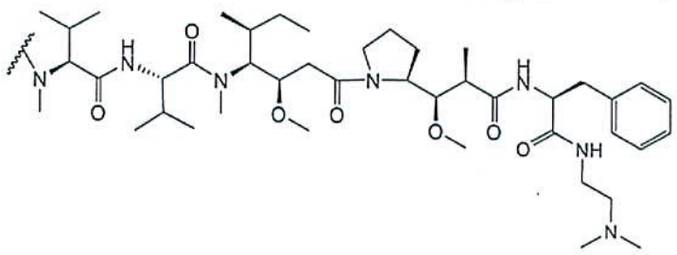


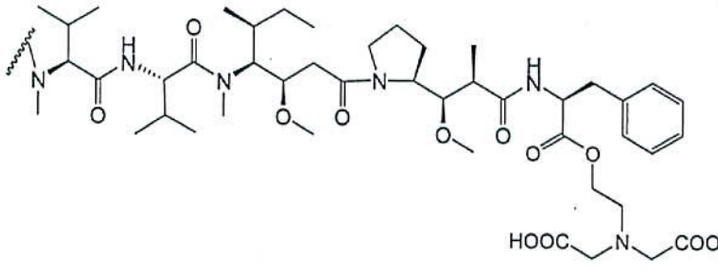


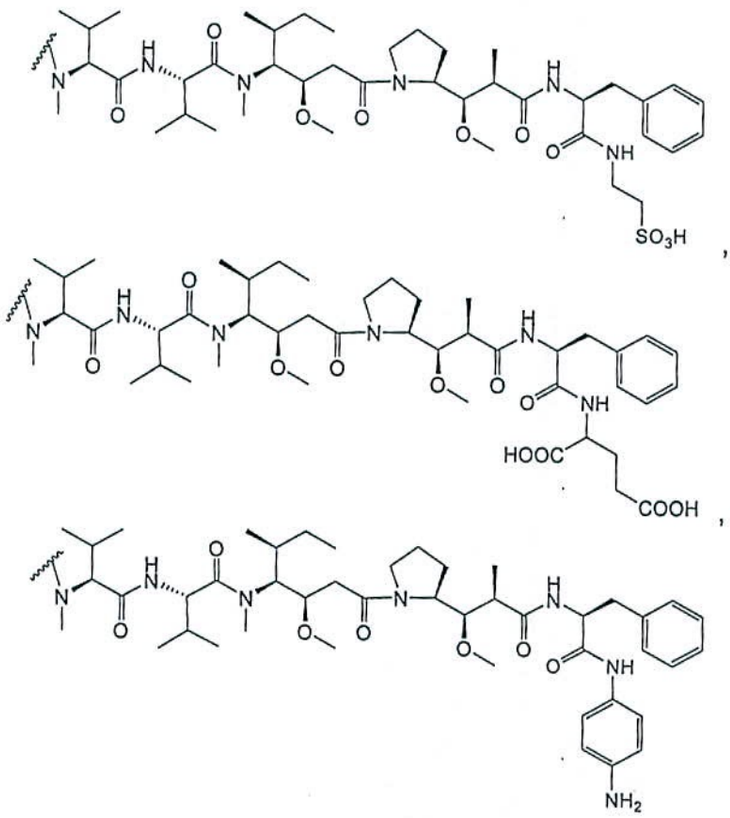












[0313] En un aspecto, los grupos hidrofílicos, como por ejemplo pero de manera no taxativa, los ésteres de trietilenglicol (TEG) se pueden unir a la molécula de auristatina de la fórmula (***X-B***) en R^{11}. Sin ser limitados por una teoría, los grupos hidrofílicos contribuyen a la internalización del agente terapéutico y a evitar su aglomeración.

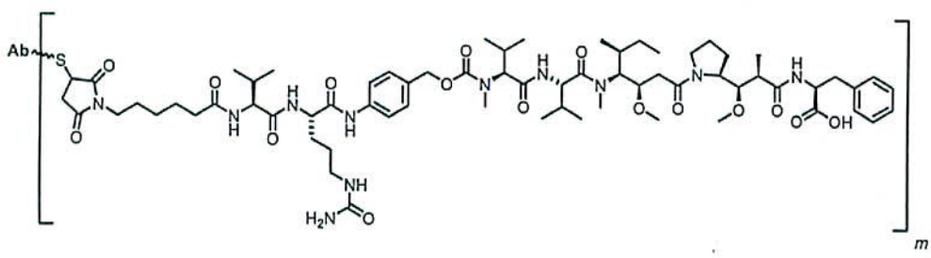
[0314] En algunas formas de realización, el agente terapéutico no es TZT-1027. En algunas formas de realización, el agente terapéutico no es auristatina E, dolastatina 10, ni auristatina PE.

[0315] En algunas formas de realización, la molécula de auristatina está conectada a una unidad cisteína en la molécula de anticuerpo por medio de un conector que contiene una unidad maleimida, por ejemplo, una unidad maleimidocaproilo.

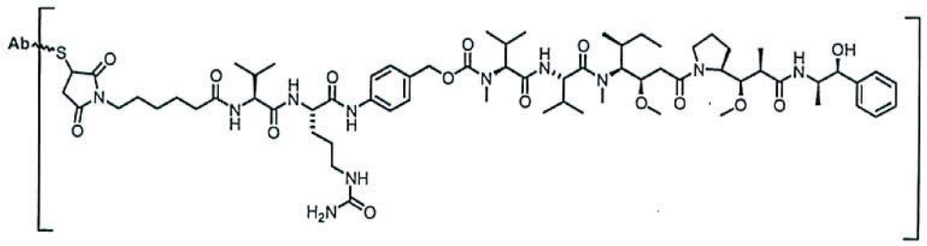
[0316] En algunas formas de realización, la molécula de auristatina se acopla a las moléculas de anticuerpo usando un conector heterobifuncional que se conecta a un grupo hidroxilo en la molécula de auristatina. En algunas de dichas formas de realización, el conector comprende una hidrazona. En algunas formas de realización, el conector es un compuesto hidrazona formado por reacción de maleimidocaproilhidrazida y un ácido cetocarboxílico, por ejemplo, ácido 5-benzoilvalérico. En algunas formas de realización en particular, el conector es ácido (Z)-6-(2-(6-(2,5-dioxo-2,5-dihidro-1H-pirrol-1-il)hexanoil)hidrazono)-6-fenilhexanoico.

[0317] En algunas otras formas de realización la molécula de auristatina se acopla al anticuerpo usando un conector heterobifuncional que se conecta a un grupo monometil amino en la molécula de auristatina. En algunas formas de realización, el conector comprende una unidad clivable, por ejemplo, una unidad peptídica, y un espaciador autofragmentante *p*-aminobencilcarbamato. Los conectores indicativos incluyen maleimidocaproilo (mc), maleimidocaproil-L-fenilalanina-L-lisina-*p*-amino bencil carbamato, y maleimidocaproil-L-valina-L-citrulina-*p*-aminobencil carbamato (vc).

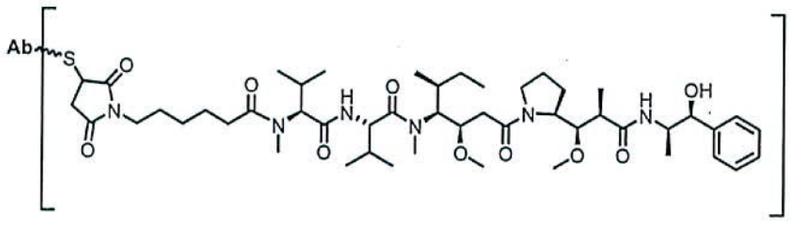
[0318] En ciertas formas de realización, el inmunoconjugado con la fórmula (***I***) está caracterizado por la fórmula Ab-(vc-MMAF)$_m$ (fórmula (***I-4***)); Ab-(vc-MMAE)$_m$ (fórmula (***I-5***)); Ab-(mc-MMAE)$_m$ (fórmula (***I-6***)); o Ab-(mc-MMAF)$_m$, (fórmula (***I-7***)), donde Ab es una molécula de anticuerpo anti-GCC según se describe aquí, S es un átomo de azufre del anticuerpo, y *m* tiene los valores y valores preferidos descritos anteriormente para la fórmula (***I***). En ciertas formas de realización, *m* es un entero entre 1 y aproximadamente 5.



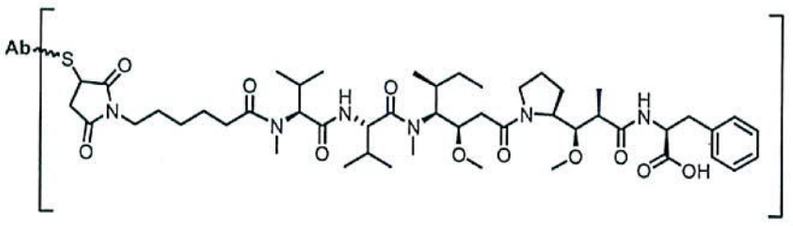
(***I-4***)



(*I-5*)



(*I-6*)



(*I-7*)

[0319] En algunas formas de realización, la variable Ab en la fórmula (*I-4*), (*I-5*), (*I-6*), o (*I-7*) es una molécula de anticuerpo con las características que se resumen en las tablas 1 a 6. En ciertas formas de realización, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 o una molécula de anticuerpo Abx-229.

[0320] En algunas formas de realización, la variable *m* en la fórmula (*I-4*), (*I-5*), (*I-6*), o (*I-7*) varía dentro del rango entre aproximadamente 2 y aproximadamente 10, entre aproximadamente 6 y aproximadamente 8, o entre aproximadamente 4 y aproximadamente 6.

[0321] En ciertas formas de realización en particular, la invención se refiere a un inmunoconjugado con la fórmula (*I-4*), (*I-5*), (*I-6*), o (*I-7*), donde Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 y *m* es aproximadamente 4.

[0322] Los inmunoconjugados que se divulgan aquí se pueden utilizar para modificar una determinada respuesta biológica. No se debe entender que el agente terapéutico se limita a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por

ejemplo, el agente terapéutico puede ser un ácido nucleico, proteína, o polipéptido que posee una actividad biológica que se desea. Por ejemplo, las moléculas de anticuerpo se pueden conjugar con una molécula antisentido, una molécula de ARNip, molécula de ARNhc o molécula miARN que puede interferir con la expresión de un gen, produciendo de esa manera un efecto biológico que se desea.

[0323] Las proteínas y polipéptidos que se pueden conjugar con las moléculas de anticuerpo de la invención incluyen, por ejemplo, toxinas y componentes de los mismos, como por ejemplo abrina, cadena A de la abrina, ricina, cadena A de la ricina, modeccina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), PE38 (exotoxina de pseudomonas truncada), gelonina, toxina de la difteria, fragmento A de toxina de la difteria, ciertas proteínas de *Aleurites fordii*, ciertas proteínas de *Dianasí caryophillus* (por ejemplo, diantina 30 y diantina 32), ciertas proteínas de *Phytolacca Americana* (por ejemplo, PAP, PAPII, y PAP-S), ciertas proteínas de *Saponaria officinlis* (por ejemplo, saporina 6), inhibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, mitogilina, restrictocina, fenomicina, y enomicina; proteínas para estimular el ataque del sistema inmune al tumor o inducir una función efectora at el tumor, como por ejemplo factor de necrosis tumoral, interferón, factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, y activador tisular de plasminógeno; y modificadores de la respuesta biológica tales como, por ejemplo, citoquinas y linfoquinas (por ejemplo, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos ("GM-CSF"), y factor estimulador de colonias de granulocitos ("G-CSF")), y otros factores de crecimiento.

[0324] Los anticuerpos de la invención también se puede conjugar o fusionar con proteínas de la superficie viral presentes en partículas virales. Por ejemplo, un anticuerpo anti-GCC de cadena única de la presente invención se puede fusionar (por ejemplo, para formar una proteína de fusión) con una proteína de

la superficie viral. Como alternativa, un anticuerpo anti-GCC completo de la presente invención, o un fragmento A del mismo, se puede conjugar químicamente (por ejemplo, mediante un conector químico) con una proteína de la superficie viral. Preferiblemente, el virus es uno que se fusiona con las membranas endocíticas, por ejemplo, un virus de influenza, de tal manera que el virus sea internalizado junto con el anticuerpo anti-GCC y de esa manera infecte a las células que expresan GCC. El virus se puede diseñar genéticamente como una toxina celular. Por ejemplo, el virus puede expresar o inducir la expresión de genes que sean tóxicos para las células, por ejemplo, genes promotores de la muerte celular. Preferiblemente, dichos virus serán incapaces de realizar una replicación viral.

[0325] Una molécula de anticuerpo anti-GCC según se la describe aquí también se puede conjugar con una prodroga o activador de prodroga. En un método para matar o suprimir células tumorales, una primera molécula de anticuerpo anti-GCC de la invención se conjuga con una prodroga que se activa solo cuando se encuentra en proximidad estrecha con un activador de prodroga. El activador de prodroga está conjugado con una segunda molécula de anticuerpo, preferiblemente una que se una a un sitio no competitivo sobre la molécula de GCC. Se puede determinar si los dos anticuerpos se unen a sitios de unión competitivos o no competitivos usando ensayos de unión competitiva convencionales. Los pares de droga-prodroga que son apropiados para utilizar 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 Colorrectal Tumor Xenografts", (1996) *Cancer Research*, 56:3287-3292.

[0326] También se pueden acoplar radioisótopos terapéuticamente activos con anticuerpos anti-GCC, o con fragmentos que se unen al antígeno, o con derivados de los mismos. Los isótopos radioactivos se pueden utilizar en aplicaciones en diagnóstico o terapéuticas. Los isótopos radioactivos que se

pueden acoplar con los anticuerpos anti-GCC incluyen, pero de manera no taxativa emisores□α-, □-, o γ-, o □- y emisores□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.), pp 303-316 (Academic Press 1985. Dichos isótopos radioactivos incluyen, pero de manera no taxativa 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 ó 2^{13}Bi), indio (^{111}In), tecnecio (^{99}mTc), fósforo (^{32}P), rodio (^{188}Rh), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^{3}H), cromo (^{51}Cr), cloro (^{36}Cl), cobalto (^{57}Co o ^{58}Co), hierro (^{59}Fe), selenio (^{75}Se), o galio (^{67}Ga). Los radioisótopos que son útiles como agentes terapéuticos incluyen itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), praseodimio, astato (^{211}At), renio (^{186}Re), bismuto (^{212}Bi ó 2^{13}Bi), y rodio (^{188}Rh). Los radioisótopos que son útiles como marcadores, por ejemplo, para utilizar en diagnósticos, incluyen yodo (^{131}I o ^{125}I), indio (^{111}In), tecnecio (^{99}mTc), fósforo (^{32}P), carbono (^{14}C), y tritio (^{3}H), o uno o más de los isótopos terapéuticos de la lista anterior.

[0327] La radioinmunoterapia (RIT) usando anticuerpos marcados con ^{131}I, ^{90}Y, y ^{177}Lu se encuentra bajo una intensa investigación clínica. Existen significativas diferencias entre las características físicas de dichos tres núclidos y como resultado, la selección de radionúclido puede ser importante para administrar una dosis de radiación máxima al tumor. Las partículas beta de mayor energía del ^{90}Y pueden ser buenas para tumores voluminosos, pero pueden no ser necesarias para tumores pequeños y especialmente para metástasis en hueso. Las partículas beta de energía relativamente baja del ^{131}I son ideales, pero la deshalogenación *in vivo* de las moléculas radioyodadas es una gran desventaja para la internaliziación del anticuerpo. Al contrario, el ^{177}Lu tiene partículas beta de baja energía con un rango de alcance de solo 0,2-0,3 mm y suministra una dosis de radiación mucho menor a la médula ósea en comparación con el ^{90}Y. Además, debido a la vida media física más prolongada

(en comparación con el ^{90}Y), los tiempos de residencia en el tumor son más largos. Como resultado, se pueden administrar mayores actividades (mayores cantidades de mCi) de agentes marcados con ^{177}Lu con dosis de radiación a la médula comparativamente menores. Se han realizado varios estudios clínicos para investigar el uso de anticuerpos marcados con ^{177}Lu en el tratamiento de diversos tipos de cáncer. (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)).

[0328] Los agentes detectables útiles con los cuales se puede derivatizar (o marcar un anticuerpo o una porción de anticuerpo de la invención) incluyen compuestos fluorescentes, diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, átomos de metal emisores de fluorescencia, por ejemplo, europio (Eu), y otros lantánidos, y materiales radioactivos (se han descrito anteriormente). Los agentes fluorescentes indicativos que son detectables incluyen fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamina-1-naftalensulfonilo, ficoeritrina etcétera. Un anticuerpo también se puede derivatizar con enzimas detectables, como por ejemplo fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, □-galactosidasa, acetilcolinesterasa, glucosa oxidasa etcétera. Cuando un anticuerpo se derivatiza con una enzima detectable, esta se detecta agregando reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción detectable. Por ejemplo, cuando está presente el agente detectable peroxidasa de rábano picante, el agregado de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina hace que se obtenga un producto de reacción coloreado, que es detectable. El anticuerpo también se puede derivatizar con un grupo prostético (por ejemplo, estreptavidina/biotina y avidina/biotina). Por ejemplo, un anticuerpo se puede derivatizar con biotina, y se lo puede detectar por medición indirecta de la unión a avidina o estreptavidina. Los ejemplos de materiales fluorescentes apropiados incluyen umbelliferona, fluoresceína,

isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un luminiscente material es el luminol; y los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina.

Composiciones farmacéuticas

[0329] En otro aspecto, la invención está dirigida a composiciones, por ejemplo, composiciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma, descrita en la presente, formulada junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. En formas de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es aquella que presenta los ejemplos de características que se resumen en las Tablas 1 y 2.

[0330] Según se usa en la presente, un "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, agentes isotónicos y agentes que demoran la absorción, y semejantes, que sean fisiológicamente compatibles. El vehículo puede ser adecuado para una administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, rectal, espinal o epidérmica (por ejemplo, por inyección o infusión). La composición farmacéutica puede incluir uno o más excipientes adicionales, por ejemplo, sales, soluciones amortiguadoras, modificadores de la tonicidad, lioprotectores, detergentes no iónicos, agentes tensioactivos y conservantes.

[0331] Las composiciones se pueden encontrar en diversas formas. Éstas incluyen, por ejemplo, formas de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y de infusión), dispersiones o suspensiones, liposomas y supositorios. La forma preferida depende del modo de administración y la aplicación terapéutica pretendidos. Algunas composiciones típicas se encuentran en la forma de soluciones inyectables o de infusión, destinadas a una administración parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular). En algunas formas de realización, el anticuerpo se administra

por infusión o inyección intravenosa. En otras formas de realización, el anticuerpo se administra por inyección intramuscular o subcutánea.

[0332] Las frases "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral", según se usan en la presente, hacen referencia a modos de administración distintos de la administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, a modo de ejemplo, la administración mediante inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoide, intraespinal, epidural e inyección intraesternal e infusión.

[0333] En algunas formas de realización, la composición farmacéutica es estéril y estable bajo las condiciones de elaboración y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, dispersión, liposoma, microesfera u otra estructura ordenada adecuada para una concentración de anticuerpo alta. Se pueden preparar soluciones inyectables estériles por incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados previamente, según necesidad, seguido por esterilización, por ejemplo por filtración. Por lo 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 que son necesarios enumerados previamente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación incluyen secado bajo vacío y secado por congelamiento, lo cual permite obtener un polvo del ingrediente activo además de cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada con esterilidad previamente. La fluidez apropiada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante el uso de agentes

tensioactivos. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede lograr incluyendo en la composición un agente que demora la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0334] Los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de la presente invención se pueden administrar mediante una variedad de métodos conocidos en el arte, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la ruta/modo de administración es por inyección intravenosa o infusión. Como podrá apreciar el especialista, la ruta y/o modo de administración varían dependiendo de los resultados deseados. En determinadas formas de realización, el compuesto activo se puede preparar con un vehículo que protegerá al compuesto contra una liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tal como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos de los métodos para la preparación de tales formulaciones están patentados o son conocidos en general por los especialistas en la técnica. Véase, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

[0335] En determinadas formas de realización, una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado descrito en la presente se puede administrar por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable. El compuesto (y otros ingredientes, si se desea) también se pueden incluir en cápsulas de gelatina dura o blanda, comprimir en tabletas, tabletas bucales, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y semejantes. Para administrar un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de la invención por otra vía que no sea la parenteral puede ser necesario recubrir el compuesto o coadministrar el compuesto con un material que impida su inactivación.

[0336] Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en el arte. Por ejemplo, las preparaciones farmacéuticas se pueden disponer dentro de un dispositivo, por ejemplo, un recipiente hermético al aire o a líquidos, que contiene una o más dosificaciones. Los ejemplos de dispositivos de administración incluyen, en un sentido no limitativo, viales, cánulas, agujas, bolsas de goteo y líneas. La invención también provee métodos para incorporar una molécula de anticuerpo o inmunoconjugado que se describe en la presente en dicho dispositivo.

[0337] En algunas formas de realización, la invención provee una molécula de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado que se describe en la presente, que está formulada en una composición de liposomas. En algunas formas de realización, el liposoma está recubierto con una molécula de anticuerpo. En algunas de tales formas de realización, el liposoma está relleno con un agente terapéutico. La administración liposómica puede permitir la administración de un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que no está ligado al anticuerpo. Este enfoque se puede usar para administrar un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que no es probable que se entrecruce con la molécula de anticuerpo o un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, que será secuestrado, o cuyo contacto con células no blanco debería minimizarse. En formas de realización particulares, el liposoma está relleno con un agente citostático o citotóxico. En determinadas formas de realización particulares, el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste de maytansinoides, auristatinas, dolastatinas, duocarmicinas, criptoficinas, taxanos, agentes alquilantes de ADN; calicheamicinas y derivados de los anteriores. En otras formas de realización, el liposoma se rellana con una secuencia de ácido nucleico que comprende moléculas de interferencia de ARN, por ejemplo, moléculas antisentido, moléculas de ARNsi, ARNhs o ARNmi, que tienen la capacidad de disminuir la expresión de GCC o la expresión de otro gen, por ejemplo, un oncogen, en células que expresan GCC. En algunas formas de

realización adicionales, el liposoma se recubre o rellena con un inmunoconjugado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente terapéutico o una marca.

[0338] Los regímenes de dosificación se ajustan para proveer la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente según lo indican las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y lograr una mayor uniformidad de dosificación. El término "forma de dosificación unitaria", según se usa en la presente, hace referencia a unidades físicamente discretas, apropiadas para dosificaciones unitarias en los sujetos a tratar; donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada del compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico que se requiera. La especificación para la forma de dosificación individual de la invención está dictada y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se desea obtener, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de las composiciones de un compuesto activo tal para el tratamiento de la sensibilidad en los individuos.

[0339] Un ejemplo de rango no limitativo de una cantidad terapéuticamente o profilácticamente eficaz de un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de la invención comprende 0,1-20 mg/kg o 1-10 mg/kg. Se debe tener en cuenta que los valores de la dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición a aliviar. También se comprenderá que, para un sujeto en particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse con el correr del tiempo, de acuerdo con la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los rangos de dosificación que se indican en la presente

solamente se presentan a modo de ejemplo y no tienen la intención de limitar el alcance o la práctica de la composición que se reivindica.

[0340] Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una cantidad "terapéuticamente eficaz" de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de la invención. Una "cantidad terapéuticamente eficaz" hace referencia a una cantidad eficaz, a las dosificaciones y por los períodos de tiempo necesarios, para obtener el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado podrá ser determinada por un especialista en el arte y puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de la enfermedad, la edad, el sexo y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o de una porción de anticuerpo para producir una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial del anticuerpo o fragmento de anticuerpo modificado es superado por los efectos terapéuticos beneficiosos. Una "dosificación terapéuticamente eficaz" preferentemente inhibe un parámetro mensurable (por ejemplo, el índice de crecimiento tumoral) en sujetos tratados en al menos un 20% aproximadamente, al menos un 40% aproximadamente, al menos un 60% aproximadamente y en algunas formas de realización al menos un 80% aproximadamente, con relación a los sujetos no tratados. La capacidad de un compuesto para inhibir un parámetro mensurable, por ejemplo, cáncer, se puede evaluar en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia en tumores humanos. Como alternativa, esta propiedad de la composición se puede evaluar examinando la capacidad del compuesto para inhibirla, siendo dicha inhibición *in vitro* usando para ello ensayos conocidos por el especialista.

[0341] También se encuentra dentro del alcance de la invención conjuntos de elementos que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado que se describe en la presente. Además se incluyen conjuntos de elementos que comprenden composiciones de liposoma que

comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado. El conjunto de elementos puede incluir uno o más elementos adicionales incluyendo: instrucciones de uso; otros reactivos, por ejemplo, una marca, un agente terapéutico o un agente de utilidad para quelar, o acoplar de otra manera, un anticuerpo a una marca o agente terapéutico, o una composición radioprotectora; dispositivos u otros materiales para preparar el anticuerpo para su administración; vehículos farmacéuticamente aceptables; y dispositivos u otros materiales para su administración a un sujeto. Las instrucciones de uso pueden incluir instrucciones para aplicaciones de diagnóstico 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 sufre de cáncer, o *in vivo*. Las instrucciones pueden incluir los lineamientos para una aplicación terapéutica incluyendo dosificaciones y/o modos de administración sugeridos, por ejemplo, en un paciente con 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 con un quelador, una marca o un agente terapéutico, o para la purificación de un anticuerpo conjugado, por ejemplo, a partir de componentes de conjugación sin reaccionar. Según se describió precedentemente, el conjunto de elementos puede incluir una marca, por ejemplo, cualquiera de las marcas que se describen en la presente. Según se describió precedentemente, el conjunto de elementos puede incluir un agente terapéutico, por ejemplo, un agente terapéutico descrito en la presente. En algunas aplicaciones el anticuerpo reaccionará con otros componentes, por ejemplo, un quelador o una marca o un agente terapéutico, por ejemplo, un radioisótopo, por ejemplo, itrio o lutecio. En dichos casos el conjunto de elementos puede incluir uno o más recipientes de reacción en los cuales conducir la reacción o un dispositivo de separación, por ejemplo, una columna cromatográfica, para su uso en la separación del

producto terminado a partir de materiales de partida o intermediarios de reacción.

[0342] El conjunto de elementos puede contener además al menos un reactivo adicional, tal como un agente de diagnóstico o terapéutico, por ejemplo, un agente de diagnóstico o terapéutico descrito en la presente, y/o una o más moléculas de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugados adicionales, formulado según corresponda, en una o más preparaciones farmacéuticas separadas.

[0343] El conjunto de elementos también puede contener un radioprotector. La naturaleza radiolítica de los isótopos, por ejemplo, de ^{90}Itrio (^{90}Y) es conocida. Con el fin de superar esta radiolisis, los radioprotectores se pueden incluir, por ejemplo, en la solución amortiguadora de reacción, siempre que los radioprotectores sean benignos, lo que significa que no inhiben ni afectan de otra forma adversamente la reacción de marcado, por ejemplo, de un isótopo, tal como de ^{90}Y, del anticuerpo. La solución amortiguadora de la formulación de la presente invención puede incluir un radioprotector, tal como albúmina de suero humano (HSA) o ascorbato, que minimiza la radiolisis debido al itrio u otros radionúclidos fuertes. Existen otros radioprotectores que son conocidos en el arte y también se pueden usar en la solución amortiguadora de formulación de la presente invención, es decir, secuestrantes de radicales libres (fenol, sulfitos, glutatión, cisteína, ácido gentísico, ácido nicotínico, palmitato de ascorbilo, HOP(:O)H_2I glicerol, sulfoxilato de formaldehído de sodio, Na_2S_2O., $Na_2S_2O_3$ y SO_2, etc.).

[0344] El conjunto de elementos provisto es de utilidad para marcar radioactivamente una proteína o péptido conjugado con un quelador con un radioisótopo terapéutico para su administración a un paciente. El conjunto de elementos incluye (i) un vial que contiene al anticuerpo conjugada con un quelador, (ii) un vial que contiene solución amortiguadora de formulación para estabilizar y administrar el anticuerpo radiomarcado a un paciente y (iii) instrucciones para conducir el procedimiento de radiomarcado. El conjunto de

elementos provee la exposición de un anticuerpo conjugado a un quelador al radioisótopo o una sal del mismo por un tiempo suficiente, bajo condiciones apropiadas, por ejemplo, según se recomienda en las instrucciones. Se produce un anticuerpo radiomarcado de suficiente pureza, actividad específica y especificidad de unión. El anticuerpo radiomarcado se puede diluir hasta una concentración apropiada, por ejemplo, en una solución amortiguadora de formulación, y administrar directamente al paciente con o sin una purificación adicional. El anticuerpo conjugado al quelador se puede suministrar en una forma liofilizada.

Usos

[0345] Las moléculas de anticuerpos anti-GCC según se describió aquí poseen utilidad para el diagnóstico *in vitro* e *in vivo*, prognosis, adquisición de imágenes, terapéutica y profiláctica. Por ejemplo, dichas moléculas de anticuerpo se pueden administrar a las células de un cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o se pueden administrar a un sujeto, por ejemplo, *in vivo*, para tratar, prevenir, y/o diagnosticar una variedad de trastornos.

[0346] Las moléculas de anticuerpo, inmunoconjugados, y proteínas de fusión que se describen aquí se pueden utilizar para modular una actividad o función de una proteína GCC, como por ejemplo la unión a un ligando (por ejemplo, la unión a ST o guanilina), transducción de señal mediada por GCC, mantenimiento del fluido intestinal, homeostasis de electrolitos, liberación de calcio intracelular (flujo de calcio), diferenciación celular, proliferación celular, o activación celular.

[0347] En un aspecto, la invención incluye un método para matar, inhibir o modular el crecimiento de una célula que expresa GCC, o para interferir con el metabolismo de esta. En una forma de realización, la invención provee un método para inhibir la señalización de la célula mediada por GCC o un método para matar una célula. El método se puede utilizar con cualquier célula o tejido que expresa GCC, como por ejemplo una célula cancerosa (por ejemplo, una

célula de cáncer del sistema gastrointestinal, tal como, por ejemplo, un cáncer de colon, estómago, o esófago), o una lesión metastásica. Los ejemplos no limitantes de células que expresan GCC incluyen células de adenocarcinoma de colon humano T84, células tumorales de colon frescas o congeladas, y células que comprenden un ácido nucleico recombinante que codifica GCC o una porción del mismo.

[0348] Los métodos de la invención incluyen los pasos de poner en contacto a la célula con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma, según se describe aquí, en una cantidad efectiva, es decir, una cantidad suficiente para inhibir la señalización de la célula mediada por GCC o una cantidad suficiente para matar la célula. El método se puede utilizar en cultivos de células, por ejemplo *in vitro, in vivo, ex vivo*, o *in situ*. Por ejemplo, se pueden cultivar en células que expresan GCC (por ejemplo, células recolectadas por biopsia de un tumor o lesión metastásica; células provenientes de una línea establecida de células de cáncer; o células recombinantes), *in vitro* en un medio de cultivo y el paso de poner en contacto se puede llevar a cabo por agregado de las moléculas de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado al medio de cultivo. En los métodos para matar células, el método comprende el uso de 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 muerte de las células que expresan GCC, incluyendo en particular a las células tumorales que expresan GCC (por ejemplo, células tumorales de colon).

[0349] Referencia a la tabla 7 puede servir como guía para seleccionar un(varios) anticuerpo(s) para usar para diversos métodos. Por ejemplo, la tabla 7 indica qué anticuerpos se confirmó que se internalizaban luego de su unión a GCC. Dichos anticuerpos pueden ser útiles al conectarse a una unidad citotóxica o una unidad para la adquisición de imágenes de las células. Los anticuerpos que no se internalizan se pueden utilizar para propósitos de

diagnóstico o métodos terapéuticos usando anticuerpo desnudos diseñados para suscitar una respuesta citotóxica mediada por la célula dependiente del anticuerpo, o tal vez para métodos para administrar liposomas.

[0350] Las moléculas de anticuerpos anti-GCC de la presente invención se unen a los dominios extracelulares de GCC o a porciones de los mismos en células que expresan el antígeno. Como resultado, al llevar a la práctica los métodos de la presente invención para matar, suprimir, o detectar células cancerosas, los anticuerpos o fragmentos que se unen al antígeno, se unen a todas dichas células, no solo a las células que están fijadas o a células cuyos dominios antigénicos intracelulares estén expuestos de otra manera al ambiente extracelular. Como consecuencia, la unión de los anticuerpos o fragmentos que se unen al antígeno, se concentra en las áreas donde existen células que expresan GCC, independientemente de si dichas células están fijadas o no fijadas, o si son viables o necróticas. Adicionalmente o como alternativa, las moléculas de anticuerpos anti-GCC, se unen a GCC y se internalizan con esta al unirse a las células que expresan el antígeno.

[0351] El método también se puede llevar a cabo en células presentes en un sujeto, como parte de un protocolo *in vivo*. En una forma de realización, el sujeto es un sujeto humano. Como alternativa, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un antígeno GCC con el cual una molécula de anticuerpo anti-GCC según se divulga aquí experimenta una reacción cruzada. Se pueden administrar a un sujeto humano una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma para propósitos terapéuticos. También se puede administrar una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado a un mamífero no humano que exprese el antígeno similar a GCC con el cual el anticuerpo experimenta una reacción cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) con propósitos veterinarios o como un modelo animal de una enfermedad en humanos. Los modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas

de dosificaciones y administración durante el transcurso del tiempo). Para las formas de realización *in vivo*, el paso de poner en contacto se lleva a cabo en un sujeto e incluye administrar una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma al sujeto en condiciones efectivas para permitir tanto la unión de las moléculas de anticuerpo al dominio extracelular de GCC expresada en la célula, como el tratamiento de la célula.

[0352] En una forma de realización, la invención provee un método para tratar cáncer por 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 se puede utilizar para el tratamiento de cualquier trastorno canceroso que incluye a por lo menos algunas células que expresan el antígeno para GCC. Según se usa aquí, el término "cáncer" se utiliza con la intención de incluir a todos los tipos de crecimientos cancerosos o procesos oncogénicos, tejidos metastásicos o células, tejidos, u órganos transformados en malignidades, independientemente del tipo histopatológico o de la etapa de invasividad. Los términos "cáncer" y "tumor" se pueden utilizar como sinónimos (por ejemplo, cuando se utilizan en el contexto de los métodos de tratamiento, "tratamiento de cáncer" y "tratamiento de un tumor" tienen el mismo significado).

[0353] En algunas formas de realización, el tratamiento es suficiente para reducir o inhibir el crecimiento del tumor del sujeto, reducir el número o el tamaño de lesiones metastásicas, reducir la carga tumoral, reducir la carga tumoral primaria, reducir la invasividad, prolongar tiempo de sobrevivencia, o mantener o mejorar la calidad de vida.

[0354] Los ejemplos de trastornos cancerosos incluyen, pero de manera no taxativa, tumores sólidos, tumores de tejidos blandos, y lesiones metastásicas. Los ejemplos de tumores sólidos incluyen malignidades, por ejemplo, sarcomas, adenocarcinomas, y carcinomas, de los diversos sistemas de órganos, como por ejemplo aquellos que afectan al colon. Los

adenocarcinomas incluyen malignidades tales como carcinoma del pulmón de células no pequeñas. Las lesiones metastásicas de los tipos de cáncer mencionados anteriormente también se pueden tratar o prevenir usando los métodos y composiciones de la invención. En algunas formas de realización, el cáncer que se va a tratar es un cáncer del sistema gastrointestinal (por ejemplo, cáncer colorrectal, cáncer de esófago, o cáncer de estómago).

[0355] En una forma de realización, el cáncer es un cáncer colorrectal, por ejemplo, adenocarcinoma colorrectal, leiomiosarcoma colorrectal, linfoma colorrectal, melanoma colorrectal, o un tumor neuroendocrino colorrectal. En una forma de realización en particular, el cáncer es cáncer de colon metastásico. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer de estómago (por ejemplo, un adenocarcinoma, linfoma, o sarcoma gástrico), o metástasis de los mismos. En otra forma de realización, el cáncer es un cáncer de esófago (por ejemplo, un carcinoma o adenocarcinoma de células escamosas del esófago).

[0356] El método puede ser útil para tratar un trastorno relevante en cualquier etapa o subclase. Por ejemplo, el método se puede utilizar para tratar etapas tempranas o tardías de cáncer de colon, o cáncer de colon de cualquiera de las etapas 0, I, IIA, IIB, IIIA, IIIB, IIIC, y IV.

[0357] En algunas formas de realización, el método para tratar cáncer (por ejemplo, cáncer colorrectal, de esófago, o de estómago) comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento una molécula de anticuerpo anti-GCC desnuda según se describió aquí. En otras formas de realización, el método comprende administrar un inmunoconjugado que comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC según se la describe aquí y un agente citotóxico. En algunas de dichas formas de realización, el inmunoconjugado se caracteriza por tener la fórmula (***I***), según se describe aquí. En ciertas formas de realización, el inmunoconjugado se caracteriza por tener la fórmula (***I-1***), (***I-2***), (***I-3***), (***I-4***), (***I-5***), (***I-6***), o (***I-7***) según se describe aquí.

En algunas formas de realización en particular, el inmunoconjugado se caracteriza por tener la fórmula (*I*), (*I-1*), (*I-2*), (*I-3*), (*I-4*), (*I-5*), (*I-6*), o (*I-7*), donde la variable Ab es una molécula de anticuerpo con las características que se resumen en las tablas 1 a 6. En ciertas formas de realización, la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9 o una molécula de anticuerpo Abx-229. En ciertas formas de realización en particular, el inmunoconjugado se caracteriza por tener la fórmula (*I-5*) o (*I-7*), donde la variable Ab es una molécula de anticuerpo 5F9.

[0358] Los métodos para administrar moléculas de anticuerpo e inmunoconjugados se han descrito anteriormente. Las dosificaciones apropiadas de las moléculas que se utilicen dependerán de la edad y el peso del sujeto y del compuesto en particular que se utilice.

[0359] En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado se administran en ciclos de tratamiento. Un "ciclo de tratamiento" consiste en un período de tratamiento, durante el cual las moléculas de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado se administran según se describió anteriormente, seguido de un período de descanso, durante el cual no se administran moléculas del anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado. El ciclo de tratamiento se puede repetir según sea necesario para conseguir el efecto que se desea.

[0360] Los anticuerpos anti-GCC según se describieron aquí (por ejemplo, moléculas desnudas de anticuerpos anti-GCC o inmunoconjugados que comprenden una molécula de anticuerpo anti-GCC y un agente terapéutico) se pueden utilizar en combinación con otras terapias. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención co-formulada con, y/o co-administrada con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, uno o más agentes anticáncer, por ejemplo, agentes citotóxicos o citostáticos, tratamiento con hormonas, vacunas, y/u otras inmunoterapias. En otras formas de realización, los anticuerpos anti-GCC se

administran en combinación con otras modalidades de tratamiento terapéutico, que incluyen cirugía, radiación, criocirugía, y/o termoterapia. Dichas terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente menores dosificaciones de los agentes terapéuticos que se administran, evitando de esa manera posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

[0361] La administración "en combinación", según se usa aquí, significa que se suministran al sujeto dos (o más) tratamientos diferentes durante el transcurso del trastorno que aflige al sujeto, por ejemplo, los dos o más tratamientos se suministran luego de que al sujeto se le ha diagnosticado el trastorno y antes de que el trastorno haya sido curado o eliminado. En algunas formas de realización, la administración de un tratamiento aún está ocurriendo cuando comienza la administración del segundo, de tal manera que hay una superposición. A veces esto se denomina aquí una "administración simultánea" o "concurrente". En otras formas de realización, la administración de un tratamiento termina antes de que comience la administración del otro tratamiento. En algunas formas de realización de cada caso, el tratamiento es más efectivo debido a la administración combinada. Por ejemplo, el segundo tratamiento es más efectivo, por ejemplo, se ve un efecto equivalente con menos del segundo tratamiento, o el segundo tratamiento reduce los síntomas en mayor extensión, de lo que se vería si el segundo tratamiento se administrase en ausencia del primer tratamiento, o se ve la situación análoga con el primer tratamiento. En algunas formas de realización, la administración es tal que la reducción de un síntoma, u otro parámetro relacionado con el trastorno es mayor de lo que se observaría con un tratamiento suministrado en ausencia del otro. Los efectos de los dos tratamientos pueden ser parcialmente aditivos, completamente aditivos, o más que aditivos. La administración puede ser tal que el efecto del primer tratamiento suministrado aún sea detectable cuando se suministra el segundo.

[0362] En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo se utilizan en combinación con un agente quimioterapéutico. Los ejemplos no taxativos de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN incluyen inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, irinotecan, topotecan, camptotecina y análogos o metabolitos de los mismos, y doxorrubicina); inhibidores de topoisomerasa II (por ejemplo, etopósido, tenipósido, y daunorrubicina); agentes alquilantes (por ejemplo, melfalán, clorambucilo, busulfan, tiotepa, ifosfamida, carmustina, lomustina, semustina, estreptozocina, decarbazina, 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).

[0363] 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); proteínas inhibidoras de tirosina quinasa (por ejemplo, imatinib mesilato y gefitinib); inhibidores de proteosomas (por ejemplo, bortezomib); inhibidores de NF-□B, que incluyen inhibidores de I□B quinasa; anticuerpos que se unen a proteínas sobreexpresadas en tipos de cáncer y de esa manera reducen la replicación celular (por ejemplo, trastuzumab, rituximab, cetuximab, y bevacizumab); y otros inhibidores de proteínas o enzimas de las cuales se sabe que su expresión está intensificada, que están sobreexpresadas o activadas en los tipos de cáncer, donde su inhibición reduce la replicación celular.

[0364] La selección del(de los) agente(s) terapéutico(s) o la modalidad de tratamiento que se combinará con una molécula de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado de la invención dependerán del trastorno que se va a tratar.

El(los) agente(s) o modalidad de tratamiento adicionales pueden incluir, por ejemplo, terapias estándar aprobadas para la indicación que esté siendo tratada. Por ejemplo, cuando las moléculas de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado del mismo se utilizan para tratar cáncer de colon, se pueden utilizar en combinación, por ejemplo, con cirugía; terapia con radiación; 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, leucovorina, irinotecan, oxaliplatino, bevacizumab, cetuximab, panitumumab, o combinaciones de los mismos (por ejemplo, oxaliplatino/capecitabina (XELOX), 5-fluorouracilo/ leucovorina/ oxaliplatino (FOLFOX), 5-fluorouracilo/leucovorina/irinotecan (FOLFIRI), FOLFOX más bevacizumab, o FOLFIRI más bevacizumab).

[0365] En otro aspecto, la invención incluye el uso de una molécula de anticuerpo anti-GCC o inmunoconjugado según se describe aquí en la fabricación de un medicamento. En una forma de realización, el medicamento es para tratar cáncer, por ejemplo, cáncer gastrointestinal. En algunas formas de realización, el medicamento comprende una molécula de anticuerpo anti-GCC con las características que se resumen en las tablas 1-6. En algunas formas de realización, el medicamento comprende una molécula de anticuerpo 5F9 o una molécula de anticuerpo Abx-229.

[0366] Los anticuerpos anti-GCC e inmunoconjugados según se describieron aquí se pueden utilizar 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" según se usa aquí, abarca la detección cuantitativa o cualitativa. La detección de GCC o proteína GCC, según se usa aquí, significa detectar la proteína GCC intacta o detectar una porción de la proteína GCC que comprende el epitopo al cual se unen las moléculas de anticuerpo anti-GCC.

[0367] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención incluye, un método para detectar proteína GCC, por ejemplo, detectar una célula o tejido que expresa GCC, por ejemplo, una célula de tumor, o un tumor con células, que expresan

GCC. El método comprende: poner en contacto un material, 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 según se la describe aquí, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre las moléculas de anticuerpo anti-GCC y proteína GCC; y detectar la formación de un complejo entre las moléculas de anticuerpo y proteína GCC, para detectar de esa manera la presencia de proteína GCC, por ejemplo, para detectar una célula o tumor que expresa GCC.

[0368] En una forma de realización, la molécula de anticuerpo anti-GCC es un inmunoconjugado que comprende una marca detectable.

[0369] En ciertas formas de realización, los tejidos incluyen tejidos normales y/o cancerosos que expresan GCC en mayores niveles con relación a otros tejidos, por ejemplo otros tejido tales como células B y/o tejidos asociados con células B.

[0370] Los métodos de detección que se describen aquí, ya sean *in vitro* o *in vivo*, se pueden utilizar para evaluar un sujeto. En una forma de realización el método se lleva a cabo *in vivo*, y se puede utilizar, por ejemplo, para la adquisición de imágenes, estadificación, evaluación o el diagnóstico de un paciente. En ciertas formas de realización, el trastorno es un trastorno proliferativo celular, como por ejemplo un cáncer o un tumor, por ejemplo, cáncer de colon.

[0371] Por lo tanto, en otro aspecto, la invención provee, un método para detectar la presencia de proteína GCC *in vitro* (por ejemplo, en una muestra biológica, como por ejemplo una biopsia de un tejido, por ejemplo, de un tejido tumoral, proveniente de un sujeto) o *in vivo* (por ejemplo, por adquisición *in vivo* de imágenes de un sujeto). El método comprende: (i) poner en contacto una muestra con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma, o administrar a un sujeto, una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma; y (ii) detectar la formación de un complejo entre

las moléculas de anticuerpo anti-GCC y proteína GCC. La formación de un complejo es indicativa de la presencia o del nivel de GCC.

[0372] En algunas formas de realización el nivel de complejo detectado en la muestra o el sujeto se compara con un valor de referencia, por ejemplo, un valor para la formación de un complejo o el nivel de GCC. En una forma de realización el nivel de GCC que supera un valor de referencia es indicativo de un trastorno mediado por GCC.

[0373] En una forma de realización el método comprende poner en contacto una muestra de referencia, por ejemplo, una muestra de control (por ejemplo, una muestra de control biológica, como por ejemplo plasma, tejido, biopsia) o un sujeto de control) con una molécula de anticuerpo anti-GCC o un inmunoconjugado de la misma y comparar el nivel de complejo detectado allí con el nivel detectado en la muestra o el sujeto.

[0374] En ciertas formas de realización, una célula o tejido de prueba se obtiene de un sujeto de quien se sospecha que padece un trastorno asociado con el aumento de la expresión de GCC.

[0375] En una forma de realización, el nivel de GCC, en una muestra del sujeto, o en el 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 tejido de origen que la célula del sujeto o una célula con GCC en niveles comparables a los de una célula similar normal. El método puede comprender, por ejemplo, en respuesta al nivel de GCC detectado, proveer un diagnóstico, prognosis, una evaluación de la eficacia del tratamiento, o la estadificación 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 el aumento de la expresión de GCC. Un mayor nivel de GCC en la muestra o el sujeto, en comparación con el material de control, también puede indicar la relativa falta de eficacia de un tratamiento, una prognosis relativamente peor, o una etapa posterior de la enfermedad. El nivel de GCC también se puede

utilizar para evaluar o seleccionar un 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.

[0376] El nivel de GCC también se puede utilizar para seleccionar o evaluar pacientes. Por ejemplo, en algunas formas de realización se puede considerar que los pacientes cuyas células tumorales expresan grandes cantidades de GCC en sus superficies son buenos candidatos para el tratamiento con moléculas de anticuerpos anti-GCC conjugadas con toxinas. En algunas formas de realización, los pacientes cuyas células tumorales expresan bajas cantidades de GCC sobre sus superficies no serán tan buenos candidatos para esto o podrían ser candidatos para la combinación de las moléculas de anticuerpo anti-GCC con un método de tratamiento adicional, o pueden ser candidatos para una terapia con anticuerpos desnudos. En otro ejemplo, la dosis de las moléculas de anticuerpo anti-GCC conjugadas con toxina se puede ajustar para reflejar el número de moléculas de GCC expresadas sobre las superficies de las células tumorales. Los pacientes con altos números de moléculas de GCC sobre las superficies celulares del tumor podrían ser tratados con menores dosis que los pacientes con menores números de moléculas de GCC. La detección de la presencia de células tumorales que expresan GCC *in vivo* puede permitir la identificación de tejidos dentro del tumor primario que expresa GCC se han metastatizado. El conocimiento de qué tejidos tienen metástasis pueden conducir a la aplicación de terapias dirigidas a tumores.

[0377] Como se expuso anteriormente, las moléculas de anticuerpo que se describieron aquí permiten evaluar la presencia de una proteína GCC en tejidos normales contra neoplásicos, mediante la cual se puede evaluar la presencia o la gravedad de la enfermedad, el progreso de la enfermedad y/o la eficacia de la terapia. Por ejemplo, se puede monitorear la terapia y evaluar su eficacia. En un ejemplo, una proteína GCC se puede detectar y/o medir en una primera

muestra que se obtiene de un sujeto con una enfermedad inflamatoria y se puede iniciar la terapia. Más adelante, se puede obtener del sujeto una segunda muestra y se puede detectar y/o medir la proteína GCC en la muestra. una reducción de la cantidad de proteína GCC detectada o medida en la segunda muestra puede ser indicativa de la eficacia terapéutica.

[0378] Los trastornos proliferativos celulares indicativos que se pueden evaluar, por ejemplo, diagnosticar, usando un anticuerpo según se divulga aquí incluyen a un trastorno proliferativo que incluye, pero de manera no taxativa, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de esófago.

[0379] En ciertas formas de realización, un método, como por ejemplo uno de los descritos anteriormente, comprende detectar la unión de un anticuerpo anti-GCC a la GCC expresada sobre la superficie de una célula o en un preparado de membrana que se obtiene de una célula que expresa GCC sobre su superficie. En ciertas formas de realización, el método comprende poner en contacto una célula con un anticuerpo anti-GCC en condiciones que favorezcan la unión del anticuerpo anti-GCC a GCC, y detectar si se forma un complejo entre el anticuerpo anti-GCC y GCC sobre la superficie celular. Un ensayo indicativo para detectar la unión de un anticuerpo anti-GCC a la GCC expresada sobre la superficie de una célula es un ensayo "FACS".

[0380] Las muestras indicativas para los métodos que se describieron aquí comprenden tejidos o fluidos corporales, como por ejemplo un exudado inflamatorio, sangre, suero, fluido intestinal, muestra de materia fecal, o biopsia. En un ejemplo, se puede obtener una muestra (*por ejemplo*, tejido y/o fluidos corporales) de un sujeto y se puede utilizar un método inmunológico apropiado para detectar y/o medir la expresión de la proteína GCC. Los métodos inmunológicos apropiados para detectar o medir la expresión de la proteína GCC incluyen ensayos de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo, inmunohistología, citometría de flujo, etcétera.

[0381] Las moléculas de anticuerpos anti-GCC que se utilizan en los métodos que se describieron aquí, por ejemplo, en la detección *in vivo e in vitro*, por ejemplo, en métodos de diagnóstico, estadificación, o adquisición de imágenes, pueden estar marcadas directa o indirectamente con una sustancia detectable para facilitar la detección del agente de unión unido o no unido. Las sustancias detectables apropiadas incluyen diversas enzimas biológicamente activas, ligandos, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales quimioluminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales cromofóricos, materiales de alta densidad electrónica, materiales paramagnéticos (por ejemplo, activos ante la resonancia magnética nuclear), y materiales radioactivos. En algunas formas de realización, las moléculas de anticuerpo anti-GCC se acoplan a un ion radioactivo, por ejemplo, indio (^{111}In), yodo (^{131}I o ^{125}I), itrio (^{90}Y), lutecio (^{177}Lu), actinio (^{225}Ac), bismuto (^{212}Bi ó 2^{13}Bi), azufre (^{35}S), carbono (^{14}C), tritio (^{3}H), rodio (^{188}Rh), tecnecio (^{99}mTc), 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).

[0382] Los marcadores indicativos incluyen fluoróforos tales como quelados de tierras raras o fluoresceína y su derivados, rodamina y su derivados, dansilo, umbelliferona, luceriferasas, por ejemplo, luciferasa de luciérnagas y luciferasa bacteriana (Patente de los EE.UU. No. 4.737.456), luciferina, y 2,3-dihidroftalazinadionas; otros marcadores indicativos incluyen peroxidasa de rábano picante (HRP), fosfatasa alcalina, galactosidasa, glucoamilasa, lisozima, oxidasas sacárido, por ejemplo, glucosa oxidasa, galactosa oxidasa, y glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, oxidasas heterocíclicas tales como uricasa y xantina oxidasa, acopladas con una enzima que emplea peróxido de hidrógeno para oxidar un precursor de tintura tal como HRP, lactoperoxidasa, o microperoxidasa, biotina/avidina, marcadores de spin, marcadores de bacteriófagos, radicales libres estables, etcétera.

[0383] Las moléculas de anticuerpo marcadas con fluoróforos y cromóforos se pueden preparar a partir de unidades estándar conocidas en el arte. Como los anticuerpos y otras proteínas absorben la luz con longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, las unidades fluorescentes se deben seleccionar para que tengan una sustancial absorción en longitudes de onda mayores de 310 nm y preferiblemente mayores de 400 nm. Una variedad de compuestos fluorescentes y cromóforos apropiados ha sido se descrita por Stryer; *Science*, 162:526 (1968) y Bry, L. et al. *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972). Los anticuerpos se pueden marcar con grupos cromóforos fluorescentes usando procedimientos convencionales tales como aquellos que se divulgan en las Patentes de los EE.UU. Nos. 3.940.475, 4.289.747, y 4.376.110.

[0384] Un grupo de sustancias fluorescentes con varias las propiedades deseables descritas anteriormente es la de las tinturas de xanteno, que incluye a las fluoresceínas derivadas de 3,6-dihidroxi-9-fenilxantidrol y Resamines y rodaminas derivadas del 3,6-diamino-9-fenilxantidrol y Lisamina rodamina B. Los derivados rodamina y fluoresceína de 9-o-carboxifenilxanthidrol tienen un grupo 9-o-carboxifenilo. Los compuestos fluoresceína con grupos de acoplamiento reactivos tales como grupos amino y isotiocianato tales como isotiocianato de fluoresceína y fluorescamina se pueden obtener fácilmente. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, con un grupo amino en la posición α o β.

[0385] Las moléculas de anticuerpo marcado se pueden utilizar, por ejemplo, para el diagnóstico y/o experimentalmente en varios contextos, que incluyen (i) aislar un antígeno predeterminado por técnicas estándar, como por ejemplo cromatografía de afinidad o inmunoprecipitación; (ii) detectar un antígeno predeterminado (por ejemplo, en un lisado celular o sobrenadante de células) para evaluar la abundancia y el patrón de expresión de la proteína; (iii) monitorear los niveles de proteína en tejidos como parte de un procedimiento

de pruebas clínicas, por ejemplo, para determinar la eficacia de un determinado régimen de tratamiento

[0386] Se pueden utilizar otros métodos para detectar la unión de anticuerpos anti-GCC a GCC. Dichos métodos incluyen, pero de manera no taxativa, ensayos de unión a antígeno conocidos en el arte, como por ejemplo transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de proteína A, e inmunohistoquímica (IHC).

[0387] La formación de un complejo entre las moléculas de anticuerpo anti-GCC y GCC se puede detectar midiendo o visualizando ya sea el anticuerpo (o fragmento de anticuerpo) unido al antígeno para GCC o moléculas de anticuerpo no unidas. Se pueden utilizar ensayos de detección convencionales, por ejemplo, transferencias Western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, inmunoensayos de fluorescencia, inmunoensayos de proteína A, e inmunohistoquímica (IHC) o radioinmunoensayos (RIA).

[0388] Como alternativa al marcado de las moléculas de anticuerpo anti-GCC, se puede analizar la presencia de GCC en una muestra por un inmunoensayo de competición utilizando estándares marcados con una sustancia detectable y moléculas de anticuerpo anti-GCC no marcadas. En este ensayo, la muestra biológica, los estándares marcados y el agente de unión a GCC se combinan y se determina la cantidad de estándar marcado que se une al anticuerpo no marcado. La cantidad de GCC en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de estándar marcado unido al agente de unión a GCC.

[0389] También es posible detectar directamente la formación de un complejo entre GCC y las moléculas de anticuerpo anti-GCC sin mayor manipulación o marcado de ningún componente (GCC o moléculas de anticuerpo), por ejemplo

utilizando la técnica de transferencia de energía de fluorescencia (FET, véase, por ejemplo, Lakowicz *et al.*, Patente de los EE.UU. No. 5.631.169; Stavrianopoulos, *et al.*, Patente de los EE.UU. No. 4.868.103). Se selecciona una marca de fluoróforo en la primera, molécula 'donadora' de tal manera que, ante la excitación con luz incidente de una longitud de onda apropiada, la energía de fluorescencia que emite será absorbida 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, las moléculas de proteína 'donadora' simplemente pueden utilizar la energía de la fluorescencia natural de los residuos de triptofano. Se seleccionan marcadores que emiten luz de diferentes longitudes de onda, de tal manera que la marca de la molécula 'aceptora' se puede diferenciar de la de la 'donadora'. Como la eficiencia de la transferencia de energía entre los marcadores se relaciona con la distancia que separa las moléculas, se pueden evaluar las relaciones espaciales entre las moléculas. En una situación en que ocurre una unión entre las moléculas, la emisión fluorescente de la marca de la molécula 'aceptora' en el ensayo debería ser máxima. Un evento de FET por la unión se puede medir convenientemente por medios estándar de detección fluorométrica bien conocidos en el arte (*por ejemplo*, usando un fluorímetro).

[0390] En otro ejemplo, la determinación de la capacidad de una molécula de anticuerpo de reconocer GCC se puede obtener sin marcar ningún componente del ensayo (GCC o moléculas de anticuerpo) utilizando una tecnología tal como el Análisis 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). Según se usa aquí, "BIA" o "resonancia de plasmón superficial" es una tecnología para estudiar interacciones bioespecíficas en tiempo real, sin marcar ninguno de los elementos interactuantes (*por ejemplo*, BIACORE™). Los cambios de masa en la superficie de unión (que indican un evento de unión) dan como resultado

alteraciones del índice de refracción de la luz cerca de la superficie (el fenómeno óptico de resonancia de plasmón superficial (SPR)), para dar como resultado una señal detectable que se puede utilizar como un indicador de reacciones en tiempo real entre moléculas biológicas.

[0391] En aún otra forma de realización, la invención provee un método para detectar *in vivo* la presencia de tejidos tumorales que expresan GCC. El método incluye (i) administrar a un sujeto (por ejemplo, un paciente con un cáncer) un anticuerpo anti-GCC o un fragmento del mismo que se une al antígeno, preferiblemente un anticuerpo o un fragmento del mismo que se une al antígeno conjugado con una marca detectable o un marcador; (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicha marca detectable o marcador de los tejidos o células que expresan GCC.

[0392] Los ejemplos de marcadores que son útiles para el diagnóstico por imágenes de acuerdo con la presente invención son radiomarcadores tales como ^{131}I, ^{111}In, ^{68}Ga, ^{123}I, ^{99m}Tc, ^{32}P, ^{125}I, ^{3}H, ^{14}C, y ^{188}Rh, marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, marcadores activos ante la resonancia magnética nuclear, isótopos emisores de positrones detectables por un único detector de tomografía computada de emisión de fotones ("SPECT") o un escáner de tomografía de emisión de positrones ("PET"), sustancias quimioluminiscentes tales como luciferina, y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. También se pueden emplear emisores de radiación de corto alcance, como por ejemplo isótopos detectables por sondas detectoras de corto alcance, como por ejemplo una sonda transrectal. El anticuerpo se puede marcar con dichos reactivos usando técnicas conocidas en el arte. Por ejemplo, véase Wensel y Meares (1983) *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, New York, para técnicas relacionadas con la radiomarcación de anticuerpos. Véase también, D. Colcher et al. *Met. Enzymol.* 121: 802-816 (1986.

[0393] En el caso de un anticuerpo radiomarcado, el anticuerpo que se administra al paciente, se localiza en el tumor que tiene el antígeno con el cual reacciona el anticuerpo, y se detecta o "se ve en imágenes" *in vivo* usando técnicas conocidas tales como barrido radionuclear usando por ejemplo, una cámara gamma o tomografía de emisión o tomografía computada. 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.), pp 65-85 (Academic Press 1985). Como alternativa, se puede utilizar un escáner de tomografía transaxial de emisión de positrones, como por ejemplo el denominado Pet VI situado en el Brookhaven National Laboratory, donde el radiomarcador emite positrones (por ejemplo, ^{11}C, ^{18}F, ^{15}O, y ^{13}N).

[0394] En otras formas de realización, la invención provee métodos para determinar la dosis, por ejemplo, dosis de radiación, a la que se exponen los diferentes tejidos cuando se administra una molécula de anticuerpo anti-GCC que está conjugada con un isótopo radioactivo a un sujeto, por ejemplo, un sujeto humano. El método incluye: (i) administrar a un sujeto una molécula de anticuerpo anti-GCC según se describe aquí, por ejemplo, una molécula de anticuerpo anti-GCC, marcada con un isótopo radioactivo; (ii) medir la cantidad de isótopo radioactivo localizada en diferentes tejidos, por ejemplo, un tumor, o la sangre, en diversos puntos de tiempo hasta que parte o todo el isótopo radioactivo haya sido eliminado del cuerpo del sujeto; y (iii) calcular la dosis total de radiación que recibe cada tejido que se analiza. Las mediciones se pueden tomar en puntos de tiempo agendados, por ejemplo, los días 1, 2, 3, 5, 7, y 12, luego de administrar al sujeto (el día 0) las moléculas de anticuerpo anti-GCC radiomarcadas. La concentración de radioisótopo presente en un determinado tejido, integrada con el transcurso del tiempo, y multiplicada por la actividad específico del radioisótopo se puede utilizar para calcular al dosis que recibe un determinado tejido. La información farmacológica generada usando moléculas de anticuerpos anti-GCC marcadas con un isótopo radioactivo, por

ejemplo, un emisor gamma, por ejemplo, ^{111}In, se puede utilizar para calcular la dosis que se espera que el mismo tejido pueda recibir de un isótopo radioactivo diferente que no pueda ser medida fácilmente, por ejemplo, un emisor beta, por ejemplo, ^{90}Y.

Secuencias de anticuerpos anti-GCC

[0395] Los anticuerpos anti-GCC se generaron mediante diversos métodos, como se describe con mayor detalle en los Ejemplos. Brevemente, se generaron los anticuerpos monoclonales 3G1 8F1 y 10B8 de ratón mediante la tecnología de inmunización tradicional en ratones convencionales. Se generaron los anticuerpos humanos monoclonales 1D2, 5F9, 5H3, 6H8, 8C2 y 10C10 usando ratones transgénicos que generan anticuerpos IgG2 completamente humanos, utilizando la tecnología transgénica Abgenix XENOMOUSE y se aislaron usando la tecnología de hibridomas. Los anticuerpos humanos 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 se generaron usando ratones transgénicos que generan anticuerpos IgG2 completamente humanos. Se aislaron anticuerpos individuales usando la tecnología Abgenix SLAM. Estos se utilizaron para obtener anticuerpos IgG1 completamente humanos. La especificidad de los anticuerpos contra GCC se evaluó mediante un ELISA y citometría de flujo (FCM). Se seleccionó un subconjunto de los anticuerpos generados para una caracterización adicional.

[0396] En la siguiente Tabla 1 se resumen, para diversos anticuerpos anti-GCC, la denominación del anticuerpo, el inmunógeno usado para generar el anticuerpo, el animal usado, la fuente, la especie y las formas aisladas de isotipos.

Tabla 1

Ab	Inmunógeno	Animal	Fuente	Especie	Isotipo
3G1	TOK107-hIg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
8F1	TOK107-hIg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
10B8	TOK107-hIg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
1D3	TOK107-hIg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k

8E12	TOK107-hIg	Ratón convencional C57	Hibridoma	Ratón	IgG1,k
5F9	TOK107-hIg	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
1D2	TOK107-hIg	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
5H3	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
6H8	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
8C2	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
10C10	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
10D3	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
1C9	Células CHO-GC-C N°27	XenoMouse	Hibridoma	Humano	IgG2,k
229	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
012	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
221	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
020	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
338	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
106	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
198	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k
393	TOK107-hIg	XenoMouse	SLAM	Humano	IgG1,k

[0397] Se determinaron las secuencias de las regiones variables de las cadenas liviana y pesada. En la Tabla 2, más adelante, se resumen las SEQ ID para las regiones variables de diversos anticuerpos. Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para las regiones variables de cada una de las cadenas pesada y liviana para anticuerpos anti-GCC de murinos y humanos se muestran en las Tablas 3 y 4, respectivamente.

[0398] Las secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos para cada una de las CDR de las cadenas pesada y liviana para anticuerpos anti-GCC se muestran en las Tablas 5 y 6, respectivamente.

[0399] Por ejemplo, en la Tabla 3, fila 9, se ilustra la secuencia de aminoácidos codificada de la región variable madura de la cadena pesada del mAb 5F9 (SEQ ID Nº. 18); y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la región variable madura de la cadena pesada del mAb 5F9 (SEQ ID Nº. 17) se muestra en la Tabla 4, fila 9. Las secuencias de aminoácidos codificadas de la CDR

(CDR) 1 (SEQ ID Nº: 106), la CDR2 (SEQ ID Nº: 108) y la CDR3 (SEQ ID Nº: 110) de la cadena pesada del mAb 5F9 se muestran en la Tabla 5, filas 25-27, respectivamente; y las secuencias de ácidos nucleicos de la CDR1 (SEQ ID Nº: 105), la CDR2 (SEQ ID Nº: 107) y la CDR3 (SEQ ID N° : 109) de la cadena pesada del mAb 5F9 se muestran en la Tabla 6, filas 25-27, respectivamente.

[0400] Por ejemplo, en la Tabla 3, fila 10, se ilustra la secuencia de aminoácidos codificada de la región variable madura de la cadena liviana del mAb 5F9 (SEQ ID Nº: 20); y la secuencia de ácidos n ucleicos que codifica la región variable kappa madura de la cadena liviana del mAb 5F9 (SEQ ID Nº: 19) se muestra en la Tabla 4, fila 10. Las secuencias de aminoácidos codificadas de la CDR (CDR) 1 (SEQ ID Nº: 112), la CDR2 (SEQ ID Nº: 114) y la CDR3 (SEQ ID Nº: 116) de la cadena liviana del m Ab 5F9 se muestran en la Tabla 5, filas 28-30, respectivamente; y las secuencias de ácidos nucleicos de la CDR1 (SEQ ID Nº: 111), la CDR2 (SEQ ID Nº: 113) y la CDR3 (SEQ ID Nº: 115) de la cadena liviana del mAb 5F9 se muestran en la Tabla 6, filas 28-30, respectivamente.

[0401] La secuenciación de las CDR permitió determinar la abundancia de residuos que podrían servir como sitios de conjugación con toxinas. Una cisteína libre no apareada en la región de unión al antígeno podría ser un sitio para la conjugación de auristatina y una lisina podría ser un sitio para la conjugación con maytansina. La conjugación de toxinas con un aminoácido de la CDR provocaría la preocupación de alterar la afinidad de unión del anticuerpo con GCC. Por consiguiente, en formas de realización las CDR carecen de un aminoácido que se pueda conjugar con un agente terapéutico.

Tabla 2. Resumen de SEQ ID NOs para las regiones variables de anticuerpos monoclonales.

mAb	Cadena de IgG	NA SEQ ID	AA SEQ ID
3G1	Cadena pesada	1	2
	Cadena liviana	3	4
8E12	Cadena pesada	5	6
	Cadena liviana	7	8
8F1	Cadena pesada	9	10
	Cadena liviana	11	12
1D3	Cadena pesada	13	14
	Cadena liviana	15	16
5F9	Cadena pesada	17	18
	Cadena liviana	19	20
5H3	Cadena pesada	21	22
	Cadena liviana	23	24
6H8	Cadena pesada	25	26
	Cadena liviana	27	28
8C2	Cadena pesada	29	30
	Cadena liviana	31	32
10C10	Cadena pesada	33	34
	Cadena liviana	35	36
10D3	Cadena pesada	286	287
	Cadena liviana	288	289
Abx-012	Cadena pesada	238	239
	Cadena liviana	240	241

Abx-020	Cadena pesada	37	38
	Cadena liviana	39	40
Abx-106	Cadena pesada	242	243
	Cadena liviana	244	245
Abx-198	Cadena pesada	41	42
	Cadena liviana	43	44
Abx-221	Cadena pesada	246	247
	Cadena liviana	248	249
Abx-229	Cadena pesada	45	46
	Cadena liviana	47	48
Abx-338	Cadena pesada	49	50
	Cadena liviana	51	52
Abx-393	Cadena pesada	53	54
	Cadena liviana	55	56

Tabla 3. Secuencia de aminoácidos de la región variable de mAb

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
1	3G1	Cadena pesada	2	QVQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLSRNAISWVRQ PPGKGLEWLGVIWTGGGTNYNSALKSRLSIRKENSKSQV FLKMNSLQTEDTARYFCARSGYDGFDYWGQGTLVTVSA
2	3G1	Cadena liviana	4	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVNYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTITSMEA EDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKLEIK

3	8E12	Cadena pesada	6	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQ RPGQGLEWIGKIGPRSGNTYYNEKFKGKATLTADKSSST AYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGTLVTVS
4	8E12	Cadena liviana	8	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLK ISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGTKLEIK
5	8F1	Cadena pesada	10	QVQLQQPGAELVKPGASVQMSCKASGYIFTGYWMYWV KQRPGQGLEWIGRIHPSDSNTNYNQKFKGKATLTVDKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYYCTHALAYWGQGTLVTVS
6	8F1	Cadena liviana	12	DVVLTQTPLTLSITIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTILSWLL QRPGQSPKRLIYLVSQLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISR VEAEDLGVYYCVQGTHLFTFGSGTKLEIK
7	1D3	Cadena pesada	14	QVQLKQSGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTDYYINWVK QRPGQGLEWIGKIGPRSGSTYYNEKFKGKATLTADKSSS TAYMQLSSLTSEDSAVYFCARWDAYWGQGTLVTVSA
8	1D3	Cadena liviana	16	DVVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLYSNGKTYLNW LQQRPGQAPKHLMYQVSKLDPGIPDRFSGSGSETDFTLK ISRVEAEDLGVYYCLQGTYYPYTFGGGTKLEIK
9	5F9	Cadena pesada	18	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQ FALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLVT VSS
10	5F9	Cadena liviana	20	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQS EDFAVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIK
11	5H3	Cadena pesada	22	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDCYMSWIR QSPGKGLEWVSYITTSGNTIYYADSVKGRFTISRDNAKNS LYLQMNSLRAEDTAVYYCARDWGWFYGMDVWGQGTTV TVSS

12	5H3	Cadena liviana	24	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHNDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPDRFSSSGSXTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLPRTFGQGTKVEIK
13	6H8	Cadena pesada	26	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAAIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTL VTVSS
14	6H8	Cadena liviana	28	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTILSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
15	8C2	Cadena pesada	30	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVGAIWYDGSNKYYAASVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVFYCARGRSSSYFDYWGQGTL VTVSS
16	8C2	Cadena liviana	32	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTILSW LQQRPGQPPRLLIYKTSNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVGAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
17	10C10	Cadena pesada	34	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAAIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRSSSYFDYWGQGTL VTVSS
18	10C10	Cadena liviana	36	DIVMTQTPLSSPVTLGQPASFSCRSSQSLVHSDGNTILSW LQQRPGQPPRLLIYKISNRFSGVPDRFSGSGAGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQATQFPTFGQGTRLEIK
35	10D3	Cadena pesada	287	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSFSGYYWSWIR QPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSR VTISVDTSKNQFALKLSSVTAADTAVYYCARERGYTYGNF DHWGQGTLVTVSS
36	10D3	Cadena liviana	289	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSRILAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGTPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYFCQQYERSFTFGPGTKVD

19	Abx-012	Cadena pesada	239	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGTLVTVSS
20	Abx-012	Cadena liviana	241	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSILAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE PEDFAVYYCQQYGSSLTFGGGTKVEIK
21	Abx-020	Cadena pesada	38	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMSWIR QAPGKGLEWISYITSSGSTIYYSASVKGRFTISRDNAKNSL YLQMNSLRAEDTAVYYCARDFSGWFGVHFDYWGQGTL VTVSS
22	Abx-020	Cadena liviana	40	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLYW YLQKPGQPPQLLIYEVSNRFSGVPNRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQSIQLTWTFGQGTKVEIK
23	Abx-106	Cadena pesada	243	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGASISHYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTSYNPSLKSRVTVSVDTSKNQFS LKLSSVTAADTAVYYCARDRLTGYFDYWGQGTLVTVSS
24	Abx-106	Cadena liviana	245	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSILAWYQQK PGQAPRLLIYGTSSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPMCSFGQGTKLEIK
25	Abx-198	Cadena pesada	42	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLDWVSDISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMHSLSAEDTAIYYCAKRRWQGYFDLWGRGTLVTV SS
26	Abx-198	Cadena liviana	44	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRARQRVDSRILAWYQQK PGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGTKVEIK
27	Abx-221	Cadena pesada	247	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGTL VTVSS

28	Abx-221	Cadena liviana	249	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRSLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDVAVYYCQQYNNWMCSFGQGTKLEIK
29	Abx-229	Cadena pesada	46	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYAMNWVR QAPGKGLEWVSGISGSGGRTYYADSVKGRFTISRDNSKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRDFWSGPFDYWGQGTL VTVSS
30	Abx-229	Cadena liviana	48	EIVMTPSSATLSVSPGERATLSCRASQSVSRNLAWYQQK PGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQS EDFAVYYCHQYSNWMCSFGQGTKLEIK
31	Abx-338	Cadena pesada	50	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRSYYWSWIRQ PAGKGLEWIGRIYISGRTTFNPSLKSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYFCARDRYYGILDYWGQGTLVTVSS
32	Abx-338	Cadena liviana	52	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSILAWYQQK PGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP EDFAVYYCQQYGSSPSTFGQGTRLEIK
33	Abx-393	Cadena pesada	54	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSIRHYYWSWIRQ PPGKGLEWIGYIYYSGSTNYNLSLKSRVTISRDTSKNQVS LKLSSVTAADTAVYYCAAGMGFDYWGQGTLVTVSS
34	Abx-393	Cadena liviana	56	DIQMTQSPSSLSASIGDRVTITCRASQAIRNDLGWYQLKP GKAPKRLIYSASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQP EDSATYYCLQHNSFPPTFGQGTKVEIK

Tabla 4. Secuencia de ácidos nucleicos de la región variable mAb

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácidos nucleicos
1	3G1	Cadena pesada	1	CAGGTGCAGCTGAAGGAGTCAGGACCTGGCCTGGTG GCGCCCTCACAGAGCCTGTCCATCACATGCACTGTCT

				CTGGGTTCTCATTAAGCAGAAATGCTATAAGCTGGGTT CGCCAGCCACCAGGAAAGGGTCTGGAGTGGCTTGGA GTAATATGGACTGGTGGAGGCACAAATTATAATTCAGC TCTCAAATCCAGACTGAGCATCCGCAAAGAGAACTCCA AGAGTCAAGTTTTCTTAAAAATGAACAGTCTACAAACTG AAGACACAGCCAGGTACTTCTGTGCCAGAAGTGGTTAC GACGGGTTTGATTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA CTGTCTCTGCA
2	3G1	Cadena liviana	3	CAGATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGC ATCTCCAGGGGAGAAGGTCACCATGACCTGCAGTGCC AGCTCAAGTGTAAATTACATGCACTGGTACCAGCAGAA GTCAGGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACAT CCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGG CAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCACCA GCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCA GCAGTGGAGTGGTAACCCGTACACGTTCGGAGGGGG GACCAAACTGGAAATAAAA
3	8E12	Cadena pesada	5	CAGGTCCAGTTGAAGCAGTCTGGAGCTGAACTGGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCT GGCTACACCTTCACTGACTACTATATAAACTGGGTGAA GCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAAG ATTGGTCCTCGAAGTGGTAATACTTACTACAATGAGAA GTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCG TCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACAT CTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGATGGGAT GCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
4	8E12	Cadena liviana	7	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGGT TACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAA GTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATATTTGA ATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCCAAAGCA CCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCCTGGCATCC CTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGAAACAGATTTT ACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTTGGG AGTTTATTACTGCTTGCAAGGTACATATTATCCGTACAC

				GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAG
5	8F1	Cadena pesada	9	CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGCAGATGTCCTGTAAGGCTTC TGGCTATATTTTCACCGGCTACTGGATGTACTGGGTGA AGCAGAGGCCTGGCCAAGGCCTTGAGTGGATTGGAAG GATTCATCCTTCTGATAGTAATACTAACTACAATCAAAA GTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCCT CCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCT GAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACCCATGCCCTTGC TTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT
6	8F1	Cadena liviana	11	GATGTTGTGTTGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGAT TACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAA GTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAAACCTATTTGA GTTGGTTATTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCG CCTAATCTATCTGGTGTCTCAACTGGACTCTGGAGTCC CTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGAACAGATTTT ACACTGAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGG GAGTGTATTACTGCGTGCAAGGTACACATTTATTCACG TTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATAAAA
7	1D3	Cadena pesada	13	CAGGTCCAGCTGAAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGGTGA AGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTC TGGCTACACCTTCACAGACTACTATATAAACTGGGTGA AGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAAA GATTGGTCCTAGAAGTGGTAGTACTTACTACAATGAGA AGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATC CTCCAGCACAGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACA TCTGAGGACTCTGCAGTCTATTTCTGTGCAAGATGGGA TGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT GCA
8	1D3	Cadena liviana	15	GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTGTCTTTGTCGGT TACCATTGGACAACCAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCAA GTCAGAGCCTCTTATATAGTAATGGAAAGACATATTTGA ATTGGTTACAACAGAGGCCTGGCCAGGCTCCAAAGCA

				CCTAATGTATCAGGTGTCCAAACTGGACCCTGGCATCC CTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGAAACAGATTTT ACACTTAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATTTGGG AGTTTATTACTGCTTGCAAGGTACATATTATCCGTACAC GTTCGGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA
9	5F9	Cadena pesada	17	CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGA AGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTT GGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCC GCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGG AAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAA GAACCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCC GCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAACGTG GATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGG AACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
10	5F9	Cadena liviana	19	GAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCACCAGGGCCACTGGAATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCAT CGGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT GTCAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGGACGTTCGGCCA AGGGACCAACGTGGAAATCAAA
11	5H3	Cadena pesada	21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACCTTCAGTGACTGCTACATGAGCTGGATC CGCCAGTCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCAT ACATTACTACTAGTGGTAATACCATTTACTACGCAGACT CTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGC CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGACTG GGGATGGTTCTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGG ACCACGGTCACCGTCTCCTCA

12	5H3	Cadena liviana	23	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGT CACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAAGTCT AGTCAGAGCCTCCTGCATAATGATGGAAAGACCTATTT GTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAA CTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGT GCCAGATAGGTTCAGTAGCAGCGGGTCNNGGACAGAT TTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATG TTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAGCTTCCT CGGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
13	6H8	Cadena pesada	25	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGT CTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGA GGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
14	6H8	Cadena liviana	27	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGT CACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT AGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTT GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGA CTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCTGGGGTC CCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT TCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGCTGAGGATGT CGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACGCAATTTCCAA CCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
15	8C2	Cadena pesada	29	caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggTCC CTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAG TAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGC AAGGGGCTGGAGTGGGTGGGAGCTATATGGTATGATG GAAGTAATAAATACTATGCAGCCTCCGTGAAGGGCCGA

				TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTA TCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT GTATTTTACTGTGCGAGAGGGAGGAGCAGCTCGTATTT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCA
16	8C2	Cadena liviana	31	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGT CACCCTTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCT AGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACCTACTT GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGA CTCCTAATTTATAAGACTTCTAACCGCTTCTCTGGGGTC CCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT TCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGGAGCTGAGGATGT CGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACGCAATTTCCAA CCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
17	10C10	Cadena pesada	33	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGT CTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTC CGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCA GCTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGA GCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGGGA GGAGCAGCTCGTACTTTGACTATTGGGGCCAGGGAAC CCTGGTCACCGTCTCCTCA
18	10C10	Cadena liviana	35	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCTCACCTGT CACCCTTGGACAGCCGGCCTCCTTCTCCTGCAGGTCT AGTCAAAGCCTCGTACACAGTGATGGAAACACGTACTT GAGTTGGCTTCAGCAGAGGCCAGGCCAGCCTCCAAGA CTCCTAATTTATAAGATTTCTAACCGGTTCTCTGGGGTC CCAGACAGATTCAGTGGCAGTGGGGCAGGGACAGATT TCACACTGAAAATCAGCAGGGTGGAAGCTGAGGATGT CGGGGTTTATTACTGCATGCAAGCTACACAATTTCCAA CCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA

35	**10D3**	**Cadena pesada**	286	CAGGTGCA GCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCG GAGACCCTGTCCC TCACCTGCGCTGTCTTTGGTGGGTCCTTCAGTGGTTAC TACTGGAGCTGG ATCCGCCAGCCCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATT GGGGAAATCAATCA TCGTGGAAACACCAACGACAACCCGTCCCTCAAGAGT CGAGTCACCATAT CAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCGCCCTGAAGCT GAGTTCTGTGACC GCCGCGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAGAAC GTGGATACACCTA TGGTAACTTTGACCACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA
36	**10D3**	**Cadena liviana**	288	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTT AGCAGCAGGTACT TAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAG GCTCCTCATCTAT GGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCACCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTG GAGCCTGAAGATT TTGCAGTGTATTTCTGTCAGCAGTATGAAAGGTCATTC ACTTTCGGCCCT GGGACCAAAGTGGAT
19	**Abx-**	**Cadena**	238	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG

	012	pesada		AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC TGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGC CCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTATCTA TATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCG AGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT CCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTTGAC TACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAG
20	Abx-012	Cadena liviana	240	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTG CATCCA GCAGGGCCGCTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAG ACTGGAG CCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGG TAGCTCCCTCACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAG ATCAA AC
21	Abx-020	Cadena pesada	37	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTC AAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATC CGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTTCAT ACATTACTAGTAGTGGTAGTACCATATACTACTCAGCCT CTGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAACGC

				CAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAG CCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGATTT CAGTGGCTGGTTCGGAGTCCACTTTGACTACTGGGGC CAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCG
22	Abx-020	Cadena liviana	39	GATATTGTGATGACCCAGACTCCACTCTCTCTGTCCGT CACCCCTGGACAGCCGGCCTCCATCTCCTGTAAGTCT AGTCAGAGCCTCCTGCATAGTGATGGAAAGACCTATTT GTATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGCCTCCACAG CTCCTGATCTATGAAGTTTCCAACCGGTTCTCTGGAGT GCCAAATAGGTTCAGTGGCAGCGGGTCAGGGACAGAT TTCACACTGAAAATCAGCCGGGTGGAGGCTGAGGATG TTGGGGTTTATTACTGCATGCAAAGTATACAACTTACGT GGACGTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA
23	Abx-106	Cadena pesada	242	CAGGTGCAGTTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC TGGTGC CTCCATCAGTCATTACTACTGGAGCTGGATCCGGCAGC CCGCCGGGAAGGGACTGGAATGGATTGGGCGTATCTA TATCA GTGGGAGGACCAGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCG AGTCACCGTGTCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT CCCTG AAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCCGTGT ATTACTGTGCGAGAGATCGGCTAACTGGGTACTTTGAC TACTG GGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGC
24	Abx-106	Cadena liviana	244	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCA GAGTGTTAGCAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAG AAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTA CATCCA

				GCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAGTGGCAG TGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGA CTGGAG CCTGAAGACTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGG TAGCTCACCCATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAG CTGGA GATCAAACG
25	Abx-198	Cadena pesada	41	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTAGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGACTGGGTCTCAG ATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGAC TCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATT CCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGCACAGCCTGAG CGCCGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAAACGG CGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTCTGGGGCCGTGGCA CCCTGGTCACTGTCTCCTCA
26	Abx-198	Cadena liviana	43	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCCTGGTACC AGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGG TTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCA CCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTAT TACTGTCAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACTTTCGG CGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
27	Abx-221	Cadena pesada	246	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATT CACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGGTATTA GTGGTA

				GTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGG CCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTAT CTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCG TATATTACTGTGCGAAAGATCGCGATTTTTGGAGTGGT CCATT TGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCC TCAGC
28	Abx-221	Cadena liviana	248	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCTGT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGTAGGGCC AGTCA GAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCCTGGTACCAGCAGAAAC CTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTACGGTGCATC CACCA GGGCCACTGGGATCCCAGCCAGGTTCAGTGGCAGTG GGTCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCT GCAGTCT GAAGATGTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAATAAC TGGATGTGCAGTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGA TCAA ACG
29	Abx-229	Cadena pesada	45	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTAC AGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACCTTTAGCCGCTATGCCATGAACTGGGTCC GCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAG GTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGGACATACTACGCAGA CTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAT TCCAAGAACACACTATATCTGCAAATGAACAGCCTGAG AGCCGAGGACACGGCCGTATATTACTGTGCGAAAGAT CGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACTACTGGGGCCA GGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

30	Abx-229	Cadena liviana	47	GAAATAGTGATGACGCCGTCTTCAGCCACCCTGTCTGT GTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGAGTGTTAGTAGAAACTTAGCCTGGTACCAGCA GAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT GCATCCACCAGGGCCACTGGTATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAATTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACT GTCACCAGTATAGTAACTGGATGTGCAGTTTTGGCCAG GGGACCAAGCTGGAGATCAAA
31	Abx-338	Cadena pesada	49	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC TGGTGGCTCCATCAGAAGTTACTACTGGAGCTGGATCC GGCAGCCCGCCGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGAC GTATTTATATCAGTGGGAGGACCACCTTCAACCCCTCC CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTGGACACGTCCAA GAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCC GCGGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCGAGAGATAGAT ATTATGGCTACCTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCT GGTCACCGTCTCCTCA
32	Abx-338	Cadena liviana	51	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTT GTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC AGTCAGAGTGTTAGCCGCAGTTACTTAGCCTGGTACCA ACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTAT GATGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGT TCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCAC CATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATT ACTGTCAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGCACCTTCGG CCAAGGGACACGACTGGAGATTAAA
33	Abx-393	Cadena pesada	53	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCCAGGACTGGTG AAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTC TGGCGGCTCCATCCGTCATTACTACTGGAGCTGGATC CGGCAGCCCCCAGGGAAGGGACTGGAGTGGATTGGG TATATCTATTACAGTGGGAGCACCAACTACAACCTCTC

				CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAAGAGACACGTCCA AGAATCAGGTCTCCCTG AAGCTGAGTTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGT ATTATTGTGCGGCGGGTATGGGCTTTGACTACTGGGG CCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
34	Abx-393	Cadena liviana	55	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCTCCCTGTCTGC ATCTATAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAA GTCAGGCCATTAGAAATGATTTAGGCTGGTATCAGCTG AAACCGGGGAAAGCCCCTAAGCGCCTGATCTATTCTG CATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAGC GGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACAATCAG CAGCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCAACTTATTACTGTC TACAGCATAATAGTTTCCCTCCGACGTTCGGCCAAGGG ACCAAGGTGGAAATCAAA

Tabla 5: Secuencia de aminoácidos de CDRs

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos
1	3G1	VH CDR1	58	RNAIS
2	3G1	VH CDR2	60	VIWTGGGTNYNSALKS
3	3G1	VH CDR3	62	SGYDGFDY
4	3G1	VL CDR1	64	SASSSVNYMH

5	3G1	VL CDR2	66	DTSKLAS
6	3G1	VL CDR3	68	QQWSGNPYT
7	8E12	VH CDR1	70	DYYIN
8	8E12	VH CDR2	72	KIGPRSGNTYYNEKFKG
9	8E12	VH CDR3	74	WDAY
10	8E12	VL CDR1	76	KSSQSLLYSNGKTYLN
11	8E12	VL CDR2	78	QVSKLDP
12	8E12	VL CDR3	80	LQGTYYPYT
13	8F1	VH CDR1	82	GYWMY
14	8F1	VH CDR2	84	RIHPSDSNTNYNQKFKG
15	8F1	VH CDR3	86	ALAY

16	8F1	VL CDR1	88	KSSQSLLYSNGKTYLS
17	8F1	VL CDR2	90	LVSQLDS
18	8F1	VL CDR3	92	VQGTHLFT
19	1D3	VH CDR1	94	DYYIN
20	1D3	VH CDR2	96	KIGPRSGSTYYNEKFKG
21	1D3	VH CDR3	98	WDAY
22	1D3	VL CDR1	100	KSSQSLLYSNGKTYL
23	1D3	VL CDR2	102	QVSKLDP
24	1D3	VL CDR3	104	LQGTYYPYT
25	5F9	VH CDR1	106	GYYWS
26	5F9	VH CDR2	108	EINHRGNTNDNPSLKS

27	5F9	VH CDR3	110	ERGYTYGNFDH
28	5F9	VL CDR1	112	RASQSVSRNLA
29	5F9	VL CDR2	114	GASTRAT
30	5F9	VL CDR3	116	QQYKTWPRT
31	5H3	VH CDR1	118	DCYMS
32	5H3	VH CDR2	120	YITTSGNTIYYADSVKG
33	5H3	VH CDR3	122	DWGWFYGMDV
34	5H3	VL CDR1	124	KSSQSLLHNDGKTYLY
35	5H3	VL CDR2	126	EVSNRFS
36	5H3	VL CDR3	128	MQSIQLPRT
37	6H8	VH CDR1	130	SYGMH

38	6H8	VH CDR2	132	AIWYDGSNKYYADSVKG
39	6H8	VH CDR3	134	GRSSSYFDY
40	6H8	VL CDR1	136	RSSQSLVHSDGNTYLS
41	6H8	VL CDR2	138	KTSNRFS
42	6H8	VL CDR3	140	MQATQFPT
43	8C2	VH CDR1	142	SYGMH
44	8C2	VH CDR2	144	AIWYDGSNKYYAASVKG
45	8C2	VH CDR3	146	GRSSSYFDY
46	8C2	VL CDR1	148	RSSQSLVHSDGNTYLS
47	8C2	VL CDR2	150	KTSNRFS
48	8C2	VL CDR3	152	MQATQFPT

49	10C10	VH CDR1	154	SYGMH
50	10C10	VH CDR2	156	AIWYDGSNKYYADSVKG
51	10C10	VH CDR3	158	GRSSSYFDY
52	10C10	VL CDR1	160	RSSQSLVHSDGNTYLS
53	10C10	VL CDR2	162	KISNRFS
54	10C10	VL CDR3	164	MQATQFPT
103	10D3	VH CDR1	291	GYYWS
104	10D3	VH CDR2	293	EINHRGNTNDNPSLKS
105	10D3	VH CDR3	295	ERGYTYGNFDH
106	10D3	VL CDR1	297	RASQSVSSRYLA
107	10D3	VL CDR2	299	GASSRAT

108	10D3	VL CDR3	301	QQYERSFT
55	Abx-012	VH CDR1	251	HYYWS
56	Abx-012	VH CDR2	253	RIYISGRTSYNPSLKS
57	Abx-012	VH CDR3	255	DRLTGYFDY
58	Abx-012	VL CDR1	257	RASQSVSSSYLA
59	Abx-012	VL CDR2	259	GASSRAA
60	Abx-012	VL CDR3	261	QQYGSSLT
61	Abx-020	VH CDR1	166	DYYMS
62	Abx-020	VH CDR2	168	YITSSGSTIYYSASVKG
63	Abx-020	VH CDR3	170	DFSGWFGVHFDY
64	Abx-020	VL CDR1	172	KSSQSLLHSDGKTYLY

65	Abx-020	VL CDR2	174	EVSNRFS
66	Abx-020	VL CDR3	176	MQSIQLTWT
67	Abx-0106	VH CDR1	263	HYYWS
68	Abx-106	VH CDR2	265	RIYISGRTSYNPSLKS
69	Abx-106	VH CDR3	267	DRLTGYFDY
70	Abx-106	VL CDR1	269	RASQSVSSSYLA
71	Abx-106	VL CDR2	271	GTSSRAT
72	Abx-106	VL CDR3	273	QQYGSSPMCS
73	Abx-198	VH CDR1	178	SYAMS
74	Abx-198	VH CDR2	180	DISGSGGSTYYADSVKG
75	Abx-198	VH CDR3	182	RRWQGYFDL

76	Abx-198	VL CDR1	184	RARQRVDSRYLA
77	Abx-198	VL CDR2	186	GASSRAT
78	Abx-198	VL CDR3	188	QQYGSSPLT
79	Abx-221	VH CDR1	275	RYAMN
80	Abx-221	VH CDR2	277	GISGSGGSTYYADSVKG
81	Abx-221	VH CDR3	279	DRDFWSGPFDY
82	Abx-221	VL CDR1	281	RASQSVSRSLA
83	Abx-221	VL CDR2	283	GASTRAT
84	Abx-221	VL CDR3	285	QQYNNWMCS
85	Abx-229	VH CDR1	190	RYAMN
86	Abx-229	VH CDR2	192	GISGSGGRTYYADSVKG

87	Abx-229	VH CDR3	194	DRDFWSGPFDY
88	Abx-229	VL CDR1	196	RASQSVSRNLA
89	Abx-229	VL CDR2	198	GASTRAT
90	Abx-229	VL CDR3	200	HQYSNWMCS
91	Abx-338	VH CDR1	202	SYYWS
92	Abx-338	VH CDR2	204	RIYISGRTTFNPSLKS
93	Abx-338	VH CDR3	206	DRYYGYLDY
94	Abx-338	VL CDR1	208	RASQSVSRSYLA
95	Abx-338	VL CDR2	210	DASSRAT
96	Abx-338	VL CDR3	212	QQYGSSPST
97	Abx-393	VH CDR1	214	HYYWS

98	Abx-393	VH CDR2	216	YIYYSGSTNYNLSLKS
99	Abx-393	VH CDR3	218	GMGFDY
100	Abx-393	VL CDR1	220	RASQAIRNDLG
101	Abx-393	VL CDR2	222	SASSLQS
102	Abx-393	VL CDR3	224	LQHNSFPPT
109	consenso	VH CDR1	302	x-x/Y-x/Y-M/W-S/N
110	consenso	VH CDR2	303	x-I-x-x-SG-[x or none]-x-T/I-[y/T/S]-x-x-L/V-K-s/G
111	consenso	VH CDR3	304	[4-6x]-G-[2-3x]-D-Y
112	consenso	VL CDR1	305	R/K-A/S-SQS-V/L-S/L-[5-9x]
113	consenso	VL CDR2	306	x-x-S-x-R-x-x
114	consenso	VL CDR3	307	Q/H/M-Q-Y/S-[5-7x]

Tabla 6. Secuencia de ácidos nucleicos de CDRs

	mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO:	Secuencia de ácidos nucleicos
1	3G1	VH CDR1	57	AGAAATGCTATAAGC
2	3G1	VH CDR2	59	GTAATATGGACTGGTGGAGGCACA AATTATAATTCAGCTCTCAAATCC
3	3G1	VH CDR3	61	AGTGGTTACGACGGGTTTGATTAC
4	3G1	VL CDR1	63	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAATTAC ATGCAC
5	3G1	VL CDR2	65	GACACATCCAAACTGGCTTCT
6	3G1	VL CDR3	67	CAGCAGTGGAGTGGTAACCCGTAC ACG
7	8E12	VH CDR1	69	GACTACTATATAAAC
8	8E12	VH CDR2	71	AAGATTGGTCCTCGAAGTGGTAAT ACTTACTACAATGAGAAGTTCAAG GGC

9	8E12	VH CDR3	73	TGGGATGCTTAC
10	8E12	VL CDR1	75	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATA GTAATGGAAAGACATATTTGAAT
11	8E12	VL CDR2	77	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
12	8E12	VL CDR3	79	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACA CG
13	8F1	VH CDR1	81	GGCTACTGGATGTAC
14	8F1	VH CDR2	83	AGGATTCATCCTTCTGATAGTAATA CTAACTACAATCAAAAGTTCAAGG GC
15	8F1	VH CDR3	85	GCCCTTGCTTAC
16	8F1	VL CDR1	87	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATA GTAATGGAAAAACCTATTTGAGT
17	8F1	VL CDR2	89	CTGGTGTCTCAACTGGACTCT
18	8F1	VL CDR3	91	GTGCAAGGTACACATTTATTCACG

19	1D3	VH CDR1	93	GACTACTATATAAAC
20	1D3	VH CDR2	95	AAGATTGGTCCTAGAAGTGGTAGT ACTTACTACAATGAGAAGTTCAAG GGC
21	1D3	VH CDR3	97	TGGGATGCTTAC
22	1D3	VL CDR1	99	AAGTCAAGTCAGAGCCTCTTATATA GTAATGGAAAGACATATTTGAAT
23	1D3	VL CDR2	101	CAGGTGTCCAAACTGGACCCT
24	1D3	VL CDR3	103	TTGCAAGGTACATATTATCCGTACA CG
25	5F9	VH CDR1	105	GGTTACTACTGGAGC
26	5F9	VH CDR2	107	GAAATCAATCATCGTGGAAACACC AACGACAACCCGTCCCTCAAG
27	5F9	VH CDR3	109	GAACGTGGATACACCTATGGTAAC TTTGACCAC
28	5F9	VL CDR1	111	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGA AACTTAGCC

29	5F9	VL CDR2	113	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
30	5F9	VL CDR3	115	CAGCAGTATAAAACCTGGCCTCGG ACG
31	5H3	VH CDR1	117	GACTGCTACATGAGC
32	5H3	VH CDR2	119	TACATTACTACTAGTGGTAATACCA TTTACTACGCAGACTCTGTGAAGG GC
33	5H3	VH CDR3	121	GACTGGGGATGGTTCTACGGTATG GACGTC
34	5H3	VL CDR1	123	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAT AATGATGGAAAGACCTATTTG
35	5H3	VL CDR2	125	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
36	5H3	VL CDR3	127	ATGCAAAGTATACAGCTTCCTCGG ACG
37	6H8	VH CDR1	129	AGCTATGGCATGCAC
38	6H8	VH CDR2	131	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAAGG GC

39	6H8	VH CDR3	133	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGAC TAT
40	6H8	VL CDR1	135	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACAC AGTGATGGAAACACCTACTTGAGT
41	6H8	VL CDR2	137	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
42	6H8	VL CDR3	139	ATGCAAGCTACGCAATTTCCAACC
43	8C2	VH CDR1	141	AGCTATGGCATGCAC
44	8C2	VH CDR2	143	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATA AATACTATGCAGCCTCCGTGAAGG GC
45	8C2	VH CDR3	145	GGGAGGAGCAGCTCGTATTTTGAC TAC
46	8C2	VL CDR1	147	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACAC AGTGATGGAAACACCTACTTGAGT
47	8C2	VL CDR2	149	AAGACTTCTAACCGCTTCTCT
48	8C2	VL CDR3	151	ATGCAAGCTACGCAATTTCCA

49	10C10	VH CDR1	153	AGCTATGGCATGCAC
50	10C10	VH CDR2	155	GCTATATGGTATGATGGAAGTAATA AATACTATGCAGACTCCGTGAAGG GC
51	10C10	VH CDR3	157	GGGAGGAGCAGCTCGTACTTTGAC TAT
52	10C10	VL CDR1	159	AGGTCTAGTCAAAGCCTCGTACAC AGTGATGGAAACACGTACTTGAGT
53	10C10	VL CDR2	161	AAGATTTCTAACCGGTTCTCT
54	10C10	VL CDR3	163	ATGCAAGCTACACAATTTCCAACC
103	10D3	VH CDR1	290	GGTTACTACTGGAGC
104	10D3	VH CDR2	292	GAAATCAATCATCGTGGAAACACC AACGACAACCCGTCCCTCAAG
105	10D3	VH CDR3	294	GAACGTGGATACACCTATGGTAAC TTTGACCAC
106	10D3	VL CDR1	296	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AGGTACTTAGCCT
107	10D3	VL CDR2	298	GGTGCATCCAGCAGGGCCACTG

108	10D3	VL CDR3	300	CAGCAGTATGAAAGGTCATTCACT T
55	Abx-012	VH CDR1	250	CATTACTACTGGAGC
56	Abx-012	VH CDR2	252	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACC AGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGT
57	Abx-012	VH CDR3	254	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGAC TAC
58	Abx-012	VL CDR1	256	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AGCTACTTAGCC
59	Abx-012	VL CDR2	258	GGTGCATCCAGCAGGGCCGCT
60	Abx-012	VL CDR3	260	CAGCAGTATGGTAGCTCCCTCACT
61	Abx-020	VH CDR1	165	GACTACTACATGAGC
62	Abx-020	VH CDR2	167	TACATTACTAGTAGTGGTAGTACCA TATACTACTCAGCCTCTGTGAAGG GC
63	Abx-020	VH CDR3	169	GATTTCAGTGGCTGGTTCGGAGTC CACTTTGACTAC
64	Abx-020	VL CDR1	171	AAGTCTAGTCAGAGCCTCCTGCAT AGTGATGGAAAGACCTATTTGTAT

65	Abx-020	VL CDR2	173	GAAGTTTCCAACCGGTTCTCT
66	Abx-020	VL CDR3	175	ATGCAAAGTATACAACTTACGTGG ACG
67	Abx-106	VH CDR1	262	CATTACTACTGGAGC
68	Abx-106	VH CDR2	264	CGTATCTATATCAGTGGGAGGACC AGCTACAACCCCTCCCTCAAGAGT
69	Abx-106	VH CDR3	266	GATCGGCTAACTGGGTACTTTGAC TAC
70	Abx-106	VL CDR1	268	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGC AGCTACTTAGCC
71	Abx-106	VL CDR2	270	GGTACATCCAGCAGGGCCACT
72	Abx-106	VL CDR3	272	CAGCAGTATGGTAGCTCACCCATG TGCAGT
73	Abx-198	VH CDR1	177	AGCTATGCCATGAGC
74	Abx-198	VH CDR2	179	GATATTAGTGGTAGTGGTGGTAGC ACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGC

75	Abx-198	VH CDR3	181	CGGCGGTGGCAGGGGTACTTCGATCTC
76	Abx-198	VL CDR1	183	AGGGCCAGGCAGCGTGTTGACAGCAGGTACTTAGCC
77	Abx-198	VL CDR2	185	GGTGCATCCAGCAGGGCCACT
78	Abx-198	VL CDR3	187	CAGCAGTATGGTAGCTCACCGCTCACT
79	Abx-221	VH CDR1	274	CGCTATGCCATGAAC
80	Abx-221	VH CDR2	276	GGTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGC
81	Abx-221	VH CDR3	278	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCATTTGACTAC
82	Abx-221	VL CDR1	280	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGAAGCTTAGCC
83	Abx-221	VL CDR2	282	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
84	Abx-221	VL CDR3	284	CAGCAGTATAATAACTGGATGTGCAGT

85	Abx-229	VH CDR1	189	CGCTATGCCATGAAC
86	Abx-229	VH CDR2	191	GGTATTAGTGGGAGTGGTGGTAGG ACATACTACGCAGACTCCGTGAAG GGC
87	Abx-229	VH CDR3	193	GATCGCGATTTTTGGAGTGGTCCA TTTGACTAC
88	Abx-229	VL CDR1	195	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGTAGA AACTTAGCC
89	Abx-229	VL CDR2	197	GGTGCATCCACCAGGGCCACT
90	Abx-229	VL CDR3	199	CACCAGTATAGTAACTGGATGTGC AGT
91	Abx-338	VH CDR1	201	AGTTACTACTGGAGC
92	Abx-338	VH CDR2	203	CGTATTTATATCAGTGGGAGGACC ACCTTCAACCCCTCCCTCAAGAGT
93	Abx-338	VH CDR3	205	GATAGATATTATGGCTACCTTGACT AC
94	Abx-338	VL CDR1	207	AGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCCG CAGTTACTTAGCC

95	Abx-338	VL CDR2	209	GATGCATCCAGCAGGGCCACT
96	Abx-338	VL CDR3	211	CAGCAGTATGGTAGTTCACCGAGC ACC
97	Abx-393	VH CDR1	213	CATTACTACTGGAGC
98	Abx-393	VH CDR2	215	TATATCTATTACAGTGGGAGCACC AACTACAACCTCTCCCTCAAGAGT
99	Abx-393	VH CDR3	217	GGTATGGGCTTTGACTAC
100	Abx-393	VL CDR1	219	CGGGCAAGTCAGGCCATTAGAAAT GATTTAGGC
101	Abx-393	VL CDR2	221	TCTGCATCCAGTTTGCAAAGT
102	Abx-393	VL CDR3	223	CTACAGCATAATAGTTTCCCTCCGA CG

[0402] Se crearon vectores de expresión, como se describió previamente, que contienen la secuencia de codificación para ambas cadenas pesada y liviana de cada uno de los anticuerpos mAb 5F9 y Abx-229.

[0403] La invención se ilustra con los siguientes ejemplos que no deben considerarse como limitaciones adicionales de la misma.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Generación de anticuerpos anti-GCC y caracterización

[0404] La generación de proteína GCC para inmunización y cribado se llevó a cabo como sigue. Se preparó antígeno GCC mediante subclonado de una porción del gen GCC que codifica para una secuencia que comprende la siguiente secuencia GCC (secuencia señal y dominio extracelular) dentro de un vector de expresión.

MKTLLLDLALWSLLFQPGWLSFSSQVSQNCHNGSYEISVLMMGNSAFA
EPLKNLEDAVNEGLEIVRGRLQNAGLNVTVNATFMYSDGLIHNSGDCRSSTCE
GLDLLRKISNAQRMGCVLIGPSCTYSTFQMYLDTELSYPMISAGSFGLSCDYK
ETLTRLMSPARKLMYFLVNFWKTNDLPFKTYSWSTSYVYKNGTETEDCFWYL
NALEASVSYFSHELGFKVVLRQDKEFQDILMDHNRKSNVIIMCGGPEFLYKLK
GDRAVAEDIVIILVDLFNDQYFEDNVTAPDYMKNVLVLTLSPGNSLLNSSFSRN
LSPTKRDFALAYLNGILLFGHMLKIFLENGENITTPKFAHAFRNLTFEGYDGPVT
LDDWGDVDSTMVLLYTSVDTKKYKVLLTYDTHVNKTYPVDMSPTFTWKNSKL
(SEQ ID NO:229)

[0405] El vector de expresión (pLKTOK107) proveyó una región C-terminal IgG1Fc para fusionarse con la secuencia GCC. Este vector comprendió un exón con la bisagra de IgG1, dominios CH2 y CH3, mutado para eliminar una cisteína no apareada del fragmento CH1 en el exón. Esta región IgG1Fc se mutó además en la lisina 235 y glicina 237 a alaninas. La construcción se expresó en forma recombinante en células de riñón de embrión humano (HEK) 293 transfectadas con el gen para antígeno T de SV40 como secuencia GCC secretada (residuo de aminoácidos entre 24 y 430 de SEQ ID NO:228) fusionada al C-terminal de un Fc de IgG1 humana. La proteína, llamada TOK107-hIg (nombre alternativo hGCC-ECD/hIgG1 Fc, SEQ ID NO:317), se

purificó mediante cromatografía de proteína A y cromatografía por exclusión de tamaño.

[0406] También se preparó antígeno GCC mediante subclonado de proteína de fusión anterior en un vector de expresión tal como pLKTOK111, que permite la fusión de la región transmembrana de la IgG2a murina en el extremo C terminal. Cuando se expresa esta construcción en forma recombinante en células CHO, el dominio extracelular GCC se detecta en la superficie celular. se consigue una alta expresión en superficie celular de la proteína de fusión GCC-Ig (SEQ ID NO:318) cuando se cotransfecta el vector pLKTOK111 con pLKTOK123, que comprende CD79a (MB-1) y CD79b (B29) murina. El clon #27 de esta transfección (CHO-GCC#27) se usó como inmunógeno. También se usaron como inmunógeno células HT-29-GCC#2.

[0407] Para el cribado de los sobrenadantes de hibridoma y los mAbs purificados por ELISA, se clonó el ácido nucleico que codifica para una construcción de fusión GCC en un vector de expresión pCMV1 (Sigma). Marcadores de purificación: se clonaron FLAG-tag (en el N-terminal) e His-tag (en el C-terminal) también dentro de la construcción. La construcción de proteína de fusión se transfectó en células 293, se expresó, y se purificó la proteína recombinante en una columna Anti-FLAG® M2-Agarose Affinity (Sigma).

[0408] Reactivos y Líneas Celulares. Se obtuvieron células HEK293, CHO y células de cáncer de colon humano T84 de ATCC y se mantuvieron de acuerdo a los protocolos de ATCC.

[0409] Ratones: Se compraron ratones hembra C57BL/6, de entre 4 y 6 semanas de edad, de Taconic Farms, Inc. (Germantown, NY) para la generación de los hibridomas murinos. Se obtuvieron xenoratones, criados en el lugar hasta entre 4 y 6 semanas de edad, que producían anticuerpos IgG2 humanos de Abgenix, Inc. (Fremont, CA) para la generación de los hibridomas humanos. Todos los animales se adquirieron y mantuvieron de acuerdo a las guías de Institutional Animal Care and Use Committee of Millennium Pharmaceuticals, Inc.

[0410] Líneas Celulares: Las líneas celulares que se usaron para los ensayos funcionales fueron pares de células transfectadas con GCC y con vector control HEK293 o células HT29. Las células HT29 se transfectaron con GCC de longitud completa bajo el control del promotor EF-1α o vector vacío (pLKTOK4) y se seleccionaron en G418. Se confirmó que la GCC de estas células tenía una respuesta cGMP ante el contacto con el péptido ST (1 a 18 o 5 a 18). Se transfectaron células HEK293 con GCC de longitud completa bajo el control del promotor CMV o con vector vacío (pN8mycSV40) y se seleccionaron con blasticidina. La GCC en estas células tiene una marca myc. Los clones seleccionados para la expresión más alta de GCC fueron 293-GCC#2, HT29-GCC#2 y HT29-GCC#5. También se usó el HT29-GCC#2 como inmunógeno para generar moléculas de anticuerpo anti-GCC. Otras células que expresan GCC son las células CT26. Para desarrollar la línea celular CT26 que expresa GCC, se usó el vector pTOK58D. Se clonó la GCC de longitud completa dentro del sitio que normalmente se usa para el clonado de la cadena pesada y se clonó luciferasa que se usa normalmente para el clonado de la cadena liviana. Luego de la transfección en células CT26, se confirmó la expresión

independiente tanto de GCC como de luciferasa. Se confirmó la expresión en superficie de GCC mediante citometría de flujo usando el anticuerpo 5F9. Se seleccionó el clon #32 para estudios adicionales.

[0411] La línea de células de cáncer de colon T84 expresa endógenamente GCC. Un análisis por Taqman de GCC en un amplio panel de líneas celulares reveló que T84 era la única línea celular que expresa ARNm para GCC. Una tinción para GCC con un mAb selectivo para GCC en pelets celulares de células T84 mostró expresión significativa de proteína GCC.

[0412] La cuantificación de los niveles de receptor GCC con ligando radiomarcado (toxina ST) sugirió que la células 293-GCC#2 expresaban más GCC que las células T84 mientras que HT29-GCC#2 o #5 expresaban la menor cantidad de moléculas de GCC por célula.

Línea Celular	**Ensayo de unión de células completas (receptor /célula)**
HT-29-GCC#2/#5	100.000
GCC endógena de T84	300.000
293-GCC	600.000

[0413] Generación de mAbs murinos mediante inmunización proteica: Se resuspendió proteína de fusión dominio extracelular de GCC humana / Ig humana (TOK107-hIg, 50 µg) en solución salina amortiguada 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 dio a los ratones una inmunización de refuerzo i.p. con 25 µg de TOK107-hIg en adyuvante incompleto de Freund. Una semana después, se colectó una pequeña cantidad de sangre de la vena de la cola y se tituló la actividad de unión en plasma contra TOK107-Ig mediante ELISA. Se seleccionaron los ratones para fusión cuando su título excedió 1:24,300 mediante ELISA o 1:500 mediante FACS. Se reforzó a los ratones seleccionados mediante inyección de 25 µg de TOK107-hIg en PBS. Cuatro días después, se sacrificó un ratón y se preparó una suspensión de células de bazo y se lavó con PBS para fusión con células P3. Un mes después, se prepararon células de bazo de otro ratón para fusión con células P3. Se ensayaron las células fusionadas para producción de anticuerpos que se unen específicamente a GCC mediante ELISA para unión a TOK107-hIg en comparación con un antígeno no GCC o con la región Fc de IgG, y mediante FACS para unión a células T84, o células Caco-2 o a células del clon HT-29 #2 en comparación con vector control, y se compararon con células MCF-7 que expresan no GCC. Se determinó el isotipo usando un conjunto de componentes para determinación de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón ISOSTRIP® (Roche Diagnostics Mannheim Alemania). Estos esquemas de inmunización y fusiones de hibridoma produjeron las moléculas de anticuerpo murino anti-GCC 1D3, 8E12, 3G1 y 10B8.

[0414] Generación de mAbs humanos. Se inmunizaron ratones modificados genéticamente *XENOMOUSE* (Abgenix, Fremont, CA) (entre 8 y 10 semanas de edad) para producción de anticuerpos monoclonales humanos. Véase, Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997), Green and Jakobovits *J. Exp. Med.* 188:483-495 (1998). Se emplearon varios esquemas de

inmunización. En un esquema, se resuspendieron cien microgramos de proteína de fusión dominio extracelular de GCC humana/ Ig humana (TOK107-hIg) en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco (PBS; GIBCO, Grand Island, NY) y se emulsionaron con un volumen igual de adyuvante completo de Freund (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Se inmunizaron los *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 dio a los ratones una inmunización de refuerzo con 50 µg de TOK107-hIg en adyuvante incompleto de Freund. La prueba en suero indicó un titulo insuficiente entonces después de unas pocas semanas de descanso, se dio un segundo refuerzo de 50 µg de TOK107-hIg humana. Dos semanas después, se colectó una pequeña cantidad de sangre de la vena de la cola y se tituló la actividad en suero contra TOK107-Ig mediante ELISA y contra células HT29-GCC#2 mediante FACS. Se seleccionaron los ratones para fusión cuando su título excedió 1:24,300 mediante ELISA, o 1:500 mediante FACS. Casi tres meses después de ese refuerzo, se reforzaron los ratones con células 10^7 HT-29 #2 y al día siguiente se reforzaron con 50 µg de TOK107-hIg, ambos en adyuvante incompleto de Freund. Un ratón inmunizado con este esquema produjo las moléculas de anticuerpo humano anti-GCC 5F9 y 1D2.

Cuatro días después, se sacrificaron los ratones y se prepararon suspensiones de células de bazo y se lavaron con PBS para la fusión. Se ensayaron las células fusionadas para producción de anticuerpos que unan específicamente a GCC mediante ELISA para unión a TOK107-hIg en comparación con un antígeno no GCC, o a la región Fc de IgG y mediante FACS para unión a células T84 o a células del clon HT-29 #2 en comparación

con vector control y en comparación con células que expresan no GCC MCF-7. Se determinó el isotipo usando ELISA o mediante FACS usando anticuerpos secundarios específicos IgG o IgM. Un ratón inmunizado con este esquema produjo las moléculas de anticuerpo humano anti-GCC 5F9 y 1D2.

[0415] En otro esquema, se usaron células CHO-GCC#27 (5 x 10^6) con el vector pkTOK111 y que expresan 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 muestra de sangre para identificar reactividad anti-GCC mediante ELISA contra TOK107-hIg, se reforzaron los ratones con células HT-29 GCC #2 (ya sea tres semanas o más de dos meses desde el refuerzo previo). Cuatro días después del último refuerzo, se tomaron los bazos respectivos para fusión de células. Se ensayaron las células fusionadas para producción de anticuerpos que unan específicamente a GCC mediante ELISA para unión a TOK107-hIg en comparación con un antígeno no GCC o a la región Fc de IgG y mediante FACS para unión a células del clon HT-29 #2 en comparación con vector control, células T84 o células MCF-7 que expresan no GCC. Se determinó el isotipo usando ELISA. Estos esquemas de inmunización y fusiones de hibridoma produjeron las moléculas de anticuerpo humano anti-GCC 5H3, 6H8, 8C2, 10C10, 10D3 y 1C9.

[0416] Hibridomas que producen mAb humanos: Se contaron células de bazo y se mezclaron con células de mieloma SP 2/0 (ATCC No. CRL8-006, Rockville, MD) que son incapaces de secretar ya sea la cadena pesada o bien la cadena liviana de inmunoglobulina en una proporción bazo: mieloma de 2:1. Se fusionaron las células con polietilenglicol 1450 (ATCC) en 12 placas de

cultivo tisular de 96 pocillos en medio de selección HAT de acuerdo a procedimientos estándar. Entre 10 y 21 días después de la fusión, las colonias de hibridoma se volvieron visibles y se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y luego cribados mediante ELISA y FACS.

[0417] Generación de anticuerpos en base a tecnología SLAM: También se aislaron anticuerpos monoclonales mediante tecnología SLAM de Abgenix (Babcook et al PNAS 93:7843-7848 (1996)). El paso inicial en este método fue inmunizar ratones XENOMOUSE con antígeno GCC mediante un esquema de entre los que se describe a continuación. Luego, el paso SLAM (Método de Anticuerpos de Linfocitos Seleccionados) involucra primero identificar dentro de una gran población de células linfoides un linfocito individual que esté produciendo un anticuerpo con una especificidad o función deseada, y luego rescatar de ese linfocito la información genética que codifica para la especificidad del anticuerpo. Se amplifica la región variable de dicho linfocito (que produce inicialmente un anticuerpo IgG2 o IgG4) y se transfiere a un vector que tiene isotipo IgG1.

[0418] Los esquemas de inmunización para los anticuerpos SLAM (por ejemplo, Abx-229, -012, -221, -020, -338, -106, -198 o -393) incluyeron el uso de TOK-hIg o TOK-hIg conjugada a hemocianina de lapa. Las inmunizaciones fueron o bien a través de la planta del pie o una combinación de la base de la cola e intraperitoneal. La inmunización inicial de 10 µg de inmunógeno incluyó o bien adyuvante de oro TITERMAX® o adyuvante completo de Freund. Se llevaron a cabo entre seis y ocho refuerzos con 5 µg de inmunógeno, usando o bien Alum, adyuvante de oro TITERMAX® o adyuvante incompleto de Freund. Si el adyuvante inicial era oro TITERMAX, alum fue el adyuvante de refuerzo y los

refuerzos se llevaron a cabo a intervalos de entre 3 y 4 días. Si la inmunización inicial y los refuerzos emplearon adyuvante completo y luego incompleto de Freund, los intervalos entre refuerzos se llevaron a cabo a intervalos de aproximadamente dos semanas. Las pruebas en suero de los títulos en los refuerzos cuarto a sexto a veces fueron seguidas por refuerzos adicionales. La refuerzo final, antes de la cosecha cuatro días después, empleó el inmunógeno en PBS.

[0419] Análisis de mAb mediante ELISA. Se recubrieron placas de EIA de 96 pocillos de alta afinidad proteica (Costar/Corning, Inc. Corning, NY) con 50 µl/pocillo de una solución 2 µg/ml (0,1 µg/pocillo) de TOK107-hIg y se incubaron durante una noche a 4°C. Se aspiró la solución en exceso y se lavaron las placas con PBS/0,05% Tween-20 (tres veces), luego se bloquearon con 1% de albúmina sérica bovina (BSA, fracción V, Sigma Chemical Co., MO) durante 1 hora a temperatura ambiente (TA) para inhibir la unión no específica. Se eliminó la solución de BSA y se agregaron 50 µl/pocillo de sobrenadante de hibridoma a cada pocillo de la placa de fusión. Luego se incubaron las placas durante 45 minutos a 37 °C y se levaron tres veces con PBS/0,05% de Tween-20, Se agregó IgG F(ab)2 de cabra anti-ratón o anti-humana conjugada con peroxidasa de rábano (HRP) (H&L) (Jackson Research Laboratories, Inc., West Grove, PA) diluido 1:4000 en 1% de BSA/PBS a cada pocillo y luego se incubaron las placas durante 45 minutos a 37°C. Luego de lavar, se agregó 50 µl/pocillo de solución de ABTS (Zymed, South San Francisco, CA). Se determinó la intensidad de los pocillos positivos de color verde a 405 nm 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 entonces a cultivos de 24 pocillos, se subclonaron mediante dilución limitante y se analizaron mediante ELISA y FACS. Los tres subclones que mejor producían se expandieron en forma adicional.

[0420]Análisis de mAb mediante citometría de flujo. Se llevó a cabo un cribado por citometría de flujo (FACS) sobre todos los sobrenadantes de placas de fusión en paralelo al cribado por ELISA. Se crecieron el clon HT-29 #2 o células HT-29 sin transfectar en botellas de T225 (Costar/Corning, Inc., Corning, NY) en DMEM (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal bovino (GIBCO). Se despegaron las células de la superficie de la botella usando Versene (GIBCO), se colectaron y se lavaron dos veces con DMEM, luego una vez con solución de 1% de BSA/PBS. Se resuspendieron las células en 1% de BSA/PBS y se agregaron $2x10^6$ células a cada pocillo de placas de fondo en V de 96 pocillos (Costar) y se centrifugaron durante 5 minutos a 2500 RPM (lavado). Se descartó la solución de lavado y se agregó 50 µl/pocillo de sobrenadante de cada pocillo de placa de fusión. Se aplicó un sellador de placas (Linbro/MP Biomedicals, LLC, Solon, OH) y luego se vortexearon suavemente las placas para resuspender y mezclar las células con los sobrenadantes y se incubaron a 4°C (en hielo) durante 30 minutos. Luego se lavaron las placas con 1% de BSA/PBS frío (tres veces) y 50 µl/pocillo de IgG F(Ab)2 de burro anti-ratón conjugado con FITC (H&L) o IgG F(Ab)2 de cabra anti-humano conjugado con FITC (H&L) (Jackson) diluidos 1:50 a cada pocillo durante 30 minutos a 4°C (en hielo en la oscuridad). Se lavaron las placas otra vez tres veces con 1% de BSA/PBS frío y se fijaron en 1% de paraformaldehído frío (Sigma)/PBS. Se transfirieron las células a tubos en clúster (Costar) y se analizaron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickenson, San José,

CA). Todo pocillo de hibridoma que haya mostrado un desplazamiento positivo se expandió luego a cultivos de 24 pocillos, y se subclonó mediante dilución limitante.

[0421] Ensayo de Internalización. Se ensayó la internalización de moléculas de anticuerpo anti-GCC tanto en células que expresan GCC como en células con vector control, usando microscopía de inmunofluorescencia. Se crecieron las células 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 en hielo. para la internalización, se reemplazó el medio con anticuerpo por medio de cultivo fresco y se cambiaron las células a 37℃ entre 2 y 3 horas o se mantuvieron en hielo. Luego de enjuagar con PBS y una breve fijación en paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, se permeabilizaron las células durante 15 minutos en 0/5% de TRITON X-100, Se determinó la localización del anticuerpo de prueba usando un anticuerpo anti-IgG marcado fluorescentemente mediante microscopía confocal de barrido láser. Las moléculas de anticuerpo se localizaron en la superficie celular de las células que expresan cuando se colocan en hielo. Ante incubación a 37℃, 5F9 mostró una tinción en puntos dentro de la membrana celular, indicativo de internalización. No se detectó internalización con las células con vector.

[0422] Resumen de Propiedades de Moléculas de Anticuerpo Anti-GCC. La mayoría de los anticuerpos que se generaron en la presente se probaron en varios ensayos descritos previamente. 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 western, IP=

inmunoprecipitación, IHC= inmunohistoquímica; la internalización usó células T84 en comparación con células MCF-7)

Tabla 7. Propiedades de moléculas de anticuerpo anti-GCC

	ELISA		FACS							
Ab	TOK107-hIg	TOK82-hIg	HT-29#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	+		+					+		+
Abx-338	+		+					+		+
Abx-393	+		+					-		+

[0423] Además, se ensayaron algunos anticuerpos para ver su habilidad para inhibir el flujo de ion calcio inducido por péptido ST en células que expresan GCC. Se llevó a cabo el ensayo cGMP en células HT29-GCC#18 en presencia de 50 nM de ST en presencia o en ausencia de moléculas de anticuerpo anti-GCC. hubo una inhibición dependiente de la dosis del flujo del ion calcio por parte de 5F9. Otros anticuerpos, 5H3 y Abx-338 también inhibieron el flujo de ion calcio inducido por ST.

[0424] Estimación de afinidad relativa de moléculas de anticuerpo anti-GCC. Se estimaron las afinidades relativas (EC50; concentración de anticuerpo para mitad de unión máxima) de algunas moléculas de anticuerpo anti-GCC a partir de medidas de ELISA contra TOK107-hIg y mediante medidas de FACS con células que expresan GCC. La siguiente tabla muestra algunos resultados.

Tabla 8. EC50 de moléculas de anticuerpo anti-GCC

Anticuerpo	EC50, TOK107-hIg, M	EC50, 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	$4,77 \times 10^{-8}$	

[0425] Medida de afinidad de moléculas de anticuerpo anti-GCC. Se usó un sistema BIACORE™ T100 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) para medir la afinidad de anticuerpo anti-GCC 5F9 a 22°C.

[0426] Paso 1: Se diluyó MAb 5F9 (Prep A) a 20 µg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0 y se diluyó MAb 5F9 de Referencia (Prep B) a 10 µg/mL en acetato de sodio 10 mM, pH 4,0. Se inmovilizó covalentemente cada mAb a varios chips CM4 BIACORE usando acoplamiento estándar con amina. Para cada chip CM4 preparado, se inmovilizó Prep A 5F9 sobre dos celdas de flujo a entre aproximadamente 75 y 100 RU mientras que se inmovilizó Prep B 5F9 a una celda de flujo a entre aproximadamente 70 y 80 RU. La restante cuarta celda de cada chip CM4 se usó como celda de flujo de referencia.

[0427] Paso 2: Se determinó la concentración madre de GCC-ECD-Fc (TOK107-hIg) usando los métodos que se detallan en Pace et al. en *Protein Science*, 4:2411 (1995), y Pace and Grimsley en *Current Protocols in Protein Science* 3.1.1-3.1.9 (2003).

[0428] Paso 3: Para cada chip CM4 preparado que se describió en el Paso 1, se inyectó GCC-ECD-Fc durante 2 minutos en un rango de concentración de entre 202 nM y 1,6 nM (dilución serial 2x) seguido por una disociación de 7 minutos. Las muestras se inyectaron al azar por triplicado con diferentes ciclos

de inyección de solución amortiguadora intercalados para doble referencia. Para obtener datos de decaimiento por disociación más significativos, se llevaron a cabo tres inyecciones adicionales de GCC- ECD-Fc 101 nM y tres inyecciones adicionales de solución amortiguadora con una inyección de 2 minutos y un tiempo de disociación de 4 horas. Se usó una tasa de flujo 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 la solución amortiguadora de corrida que era solución salina amortiguada con Hepes, 0,005% de polisorbato 20, pH 7,4 (HBS-P) con 100 µg/mL de BSA agregada.

[0429] Paso 4: Todos los datos de sensogramas (gráfica de resonancia de plasmón superficial vs tiempo) se procesaron con el programa Scrubber 2.0 (BioLogic Software, Campbell, Australia) y se ajustaron globalmente a un modelo de interacción 1:1 incluyendo un término para la constante de transporte de masa k_m usando el programa CLAMP™ (Myszka and Morton *Trends Biochem. Sci.* 23:149-150 (1998)).

[0430] El modelo 1:1 proveyó un ajuste muy bueno para los datos siempre y cuando los niveles de inmovilización de los mAb se mantuvieran lo suficientemente bajos de modo que el R_{max} resultante del análisis global de los datos de sensograma estuviese al menos por debajo de 12 RU para cada superficie. En la mayoría de los casos, una de las dos superficies de Prep A de 5F9 tuvo un R_{max} demasiado bajo (por debajo de 2 RU) para medidas cinéticas confiables. Los datos de las dos celdas de flujo de unión de GCC-ECD-Fc a Prep A 5F9 desde el mismo chip CM4 se ajustaron en forma simultánea siempre que fue posible, sin embargo. Cuando se prepararon superficies de

mAb resultando en un mayor R_{max} (> 12 RU), los sensogramas mostraron claramente cinéticas complejas y por lo tanto el modelo 1:1 ajustó los datos de manera pobre. 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 muy probablemente incrementa la probabilidad de que la GCC-ECD-Fc se una ávidamente a la superficie. Las réplicas informadas para este estudio incluyen solo los datos que se ajustaron bien al modelo de interacción 1:1. Las K_D's y constantes de velocidad resultantes de todas las réplicas para Prep A de 5F9 y la Prep B de mAb de referencia se listan en la Tabla 9 y Tabla 10, respectivamente.

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

Réplica	R_{max} (RU)	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
Promedio (95% de Conf. Int.)		$1,10\ (0,13) \times 10^5$	$1,46\ (0,59) \times 10^{-5}$	136 (65)

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

Réplica	R_{max} (RU)	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
Promedio (95% de Conf. Int.)		$1,07 (0,25) \times 10^5$	$1,13 (0,54) \times 10^{-5}$	103 (31)

Conjugación de Toxinas a Anticuerpos

[0431] Maitansinas. Se generaron anti- (MAH)-IgG-DM1, y anti-GCC-DM1 humanas de ratón de acuerdo a un proceso de un paso para la producción de conjugados citotóxicos de maitansinoides como se describe en la Patente de los EE.UU. No. 6.441.163.

[0432] Brevemente, se conjugaron maitansinoides a anticuerpos usando procedimientos publicados. Se conjugó DM1 a anticuerpos usando el entrecruzador heterobifuncional SMCC (succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato; Chari et al. *Cancer Research* 52:127-131 (1992). Se conjugó DM4 a anticuerpos usando el entrecruzador heterobifuncional SPDB (Widdison et al. *J. Med. Chem.* 49:4392-4408 (2006)). Se separó el anticuerpo conjugado de los subproductos de reacción que no reaccionaron mediante cromatografía de filtración en gel usando una columna SEPHADEX™ G-25.

[0433] Auristatinas. La conjugación por auristatinas se puede llevar a cabo usando procedimientos publicados (por ejemplo, Doronina *et al., Nature Biotech.*, 21: 778-784 (2003)). En general, las auristatinas se unen a cisteínas de las cadenas de anticuerpo. La unión a las cisteínas se lleva a cabo primero mediante reducción de los puentes disulfuro de la molécula de anticuerpo. El

proceso de reducción trata de limitar la reducción de algunos, pero no necesariamente todos, los puentes disulfuro intercadena. Como consecuencia, las auristatinas son capaces de unirse a las cisteínas libres. La extinción de la reacción de conjugación es seguida por la eliminación de los subproductos de reacción y por intercambio de solución amortiguadora por la formulación deseada.

[0434] Brevemente, una molécula de anticuerpo anti-GCC a 7,6 mg/mL se preequilibra a 37°C, y luego se agrega un 15% de volumen de borato de sodio 500 mM, pH 8,0 para elevar el pH a entre 7,5 y 8,0. La solución también contiene DTPA 1 mM. El anticuerpo se reduce parcialmente mediante agregado de 2,6 equivalentes de *tris*(2-carboxietil)fosfina (TCEP) por mol de molécula de anticuerpo anti-GCC, y se agita a 37°C. Después de 28 minutos, se coloca la solución de molécula de anticuerpo anti-GCC reducida en hielo, luego se trata inmediatamente con entre 4,8 y 4,9 equivalentes molares (relativos a la molécula de anticuerpo anti-GCC) de droga entrecruzadora (por ejemplo, mc-vc-MMAF o mc-vc-MMAE o mc-MMAF) como una solución 20,5 mM en DMSO. Se introduce DMSO adicional para llevar la mezcla a 10% de DMSO en volumen. Se agita la mezcla de reacción en hielo durante ~90 minutos antes del tratamiento con un exceso molar de 5 veces de N-acetil cisteína (en relación a mc-vc-MMAF). Se aísla el conjugado mediante filtración de flujo tangencial, concentrando primero a ~10 mg/mL, luego diafiltrando a ~10 diavolúmenes de PBS. Los conjugados de anticuerpo droga resultantes tienen una carga de droga promedio de aproximadamente cuatro unidades de droga entrecruzadora por anticuerpo. Por conveniencia, en los siguientes Ejemplos y Figuras adjuntas, los inmunoconjugados de auristatina se

denominan con el siguiente formato abreviado, más allá de la carga de droga: "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 denominan con el siguiente formato, por ejemplo, 5F9-vc-MMAF, 5F9-vc-MMAE, y 5F9-mc-MMAF.

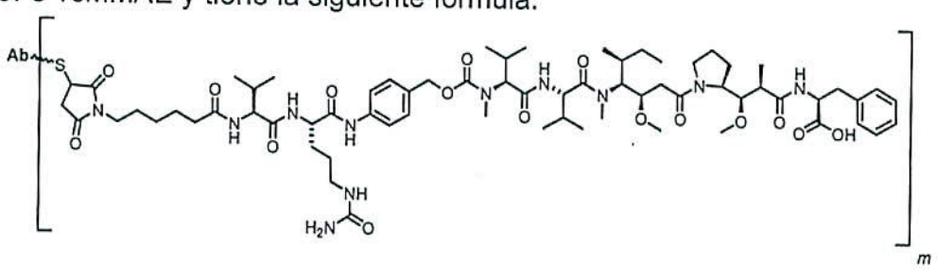
[0435] Para preparar conjugados de anticuerpo droga con una carga de droga promedio de aproximadamente dos unidades de droga entrecruzadora por anticuerpo, se modifica el protocolo (anterior) mediante la reducción de la cantidad de TCEP en un 50%. La cantidad de droga entrecruzadora también se reduce en un 50%. El conjugado de anticuerpo droga correspondiente se abrevia como Ab-vc-MMAF(2).

Preparación de 5F9 vcMMAE

[0436] Usando un método similar al método general que se estableció previamente, se conjugó el 5F9 mAb a un derivado de auristatina designado MMAE (Fórmula (***XIII***)) usando un entrecruzador vc (Val-Cit) que se describe en la presente para crear el inmunoconjugado designado como 5F9 vcMMAE. La conjugación del adaptador vc a MMAE (Seattle Genetics, Inc., Bothell, WA) se completó como se describió previamente (véase, por ejemplo, EE.UU. 2006/0074008).

[0437] Brevemente, se ajustó a pH 8 una solución 17,8 mg/mL del mAb 5F9 en acetato 100 mM a pH 5,8 con fosfato de sodio dibásico 0,3 M, rindiendo una

concentración final de mAb de 11,3 mg/ml. Luego, se agregó DTPA para una concentración final de 1 mM en la mezcla de reacción. Luego se redujo parcialmente el mAb mediante agregado de 2,28 equivalentes molares de TCEP (en relación a los moles de mAb), y luego se agitó a 37°C durante 1,5 horas. La solución de mAb parcialmente reducida se enfrió entonces a 4°C, y se agregaron 4,4 equivalentes molares de vcMMAE (en relación a los moles de anticuerpo) como una solución 20,3 mM en DMSO. Se agitó la mezcla durante 30 minutos a 22°C, luego por 15 minutos adicionales luego del agregado de 5 equivalentes molares de N-acetilcisteína (en relación a los moles de vcMMAE). Se eliminó el exceso de vcMMAE extinguido y de otros componentes de reacción mediante ultrafiltración/diafiltración del inmunoconjugado con 10 diavolúmenes de PBS, pH 7,4. El inmunoconjugado resultante se designó como 5F9 vcMMAE y tiene la siguiente fórmula:



en donde Ab es el mAb 5F9, y *m* es entre 1 y 8. La carga de droga promedio (*m*) fue de aproximadamente 3,6.

[0438] Ensayos de citotoxicidad. Para medir la habilidad de cada anticuerpo para unir, internalizar y matar células que expresan el objetivo, se llevaron a cabo ensayos de toxicidad. En este ensayo, se incubaron células con diferentes concentraciones del anticuerpo anti-GCC primario sin conjugar y una concentración fija no tóxica de anticuerpo secundario anti-Fc humana conjugado con DM1 (citotoxicidad indirecta) o con diferentes concentraciones

de mAb anti-GCC conjugado con toxina (citotoxicidad directa). Se midió la viabilidad celular mediante ensayo WST después de 4 días de incubación. La potencia relativa de los anticuerpos anti-GCC humanos sobre células 293-GCC#2 se muestra en la Tabla 8 y se determinó usando un mAb de ratón anti-IgG humana conjugado con DM1 (se purificó MAH-IgG a partir del clon HP607 (CRL1753, ATCC). 5F9 y 229 son los mAb anti-GCC más potentes con LD50 de 26 y 78 pM. A pesar de que aquí no se muestra, el error por lo general está dentro del 20% de estos promedios, según la medida mediante rango de réplicas o desviación estándar de > 2 réplicas.

Tabla 11. Resultados de ensayos de toxicidad para anticuerpos anti-GCC en células 293-GCC#2

Anti-GCC Ab	LD50 (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

[0439] Unión a superficie celular. Se evaluó la unión de 5F9 sin conjugar o 5F9 conjugado a auristatinas, mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta usando citometría de flujo. Se plaquearon 1 X 10^6 células/ pocillo en una placa de fondo en V de 96 pocillos y se incubaron en hielo durante 1 hora con diluciones seriadas de anticuerpo de entre 1 y 0,001 µg/ml. Se lavaron las células dos veces con FBS al 3% en PBS enfriado en hielo y se incubaron con 1:200 de anticuerpo de ratón anti- PE IgG humana (Southern Biotech 2043-09) durante 1 hora en hielo. Se lavaron las células otra vez y se analizaron mediante citometría de flujo en un citómetro de flujo BD FACS Canto II. Se analizaron los datos usando un programa de sistema FACS Canto II y se determinaron las intensidades de fluorescencia promedio.

[0440] Mapeo de epitope. Se iniciaron múltiples estrategias para identificar epitopes.

Arreglo de péptidos. Se generaron péptidos de 20 miembros, con solapamiento de 15 aminoácidos, cubriendo el dominio extracelular (ECD) dentro del dominio transmembrana de GCC (aminoácidos 1 a 440). Los péptidos se sintetizaron y se proveyeron como arreglos, inmovilizados sobre láminas de vidrio. Se hibridizaron los arreglos con cada uno de los anticuerpos anti-GCC para determinar si los péptidos lineales eran suficientes para la unión. Abx-198 unió a los péptidos 55 y 56, mientras que los anticuerpos 3G1, 8F1 y 10B8 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 unieron a los péptidos 71 y 72. La secuencia, FAHAFRNLTFEGYDGPVTLDDWGDV (SEQ ID NO:226), y la secuencia RNLTFEGYDGPVTLD (SEQ ID NO:315) solapan a los dos péptidos.

[0441] Unión a superficie celular de mutantes truncados de GCC. Se generaron mutantes truncados de las GCC ECD (péptido maduro FL y 8 truncados (Δ1-32, Δ1-49, Δ1-94, Δ1-128, Δ1-177, Δ1-226, Δ1-279, Δ1-229 y Δ1-379), como construcciones marcadas con FLAG (pFLAG-CMV-3), que representan aproximadamente deleciones con incrementos de 50 aminoácidos. Se expresaron las construcciones en células 293, seguido de inmunoprecipitación mediante la molécula de anticuerpo anti-GCC y transferencia Western para el epitope FLAG en lisados de células 293 transfectadas con los mutantes de GCC ECD. El anticuerpo 5F9 se une a células con la mutación Δ1-32, pero no lo hace a células con la mutación Δ1-49. La unión de 5F9 a GCC se perdió cuando la proteína se trunca entre los aminoácidos 33 y 50, lo que sugiere que esta región está involucrada en el reconocimiento de 5F9 con su epitope de unión sobre GCC. Sin embargo, debido a que las secuencias de GCC de rata y ratón son idénticas a la GCC humana en esta región, y debido a que 5F9 no une GCC de rata o ratón, el anticuerpo 5F9 probablemente se une a un epitope conformacional formado por la presencia de los aminoácidos 33 y 50 de la GCC humana.

EJEMPLO 2. Selección por toxina-entrecruzador / caracterización de ADC

[0442] En una estrategia de conjugado de anticuerpo droga (ADC), la conjugación de toxinas altamente potentes a anticuerpos, se puede dirigir la citotoxicidad de la toxina a tumores en una forma específica contra objetivo,

administrando la toxina a células de tumor que expresan el antígeno sin afectar a las células negativas para el antígeno de tejidos normales, lo que reduce por lo tanto la toxicidad sitémica. Se evaluaron toxinas de las clases auristatina (análogo de dolastatina 10) y maitansina como ADCs con mAb anti-GCC. Estas toxinas son todas inhibidoras de la polimerización de microtúbulos, actuando como antimitóticos. Las pruebas en donde se contactó a las células con toxinas libres indicaron que la citotoxicidad de las toxinas libres no distingue entre células con expresión de GCC y células control son GCC. Estas toxinas libres fueron potentes contra células 293-vector, 293-GCC#2, en células HT29-vector vs. HT29-GCC#5 como se muestra en la Tabla 9.

Tabla 12. Citotoxicidad de toxinas libres

	MMAE		MMAF		DM1		DM4	
Línea celular	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD	LD50	SD
293 vector	0,07	6	3,37	2,34	2,83	2,00	0,79	0,79
293 GCC#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#5	7	4	7,65	3,32	1,00	0,14	0,40	0,17

[0443] La química por la cual se conjugan las diferentes toxinas a los anticuerpos difiere y afecta la estabilidad del entrecruzador. La estabilidad del entrecruzador afecta la ventana terapéutica mediante un impacto en la liberación de la droga a la sangre o a tejidos no objetivos vs. liberación de la droga en el tumor. El entrecruzador ideal para ADC tiene una alta estabilidad mientras que está en la sangre, pero una liberación eficaz ante la entrada a la célula mediada por el objetivo.

Auristatinas

[0444] Se evaluaron tres pares de auristatina-entrecruzador. Para evaluar primero estos conjugados *in vitro* y luego determinar que toxina-entrecruzador usar para estudios a gran escala *in vivo*, se conjugó 5F9 a vcMMAE, vcMMAF y mcMMAF (20 mg por conjugado).

[0445] Las auristatinas son toxinas sintéticas relacionadas con el producto natural dolastatina 10, MMAE y MMAF difieren sutilmente, en donde la forma MMAF teniendo un grupo acido carboxílico en la posición R2, lo que reduce la permeabilidad celular y la potencia como toxina libre. MMAE es un sustrato de bombeo de droga Pgp, mientras que MMAF no lo es.

[0446] Las auristatinas se conjugan a cisteínas intercadena a través de un proceso de reducción parcial de anticuerpo, reacción con una droga de maleimida, extinción con cisteína en exceso, concentración e intercambio de solución amortiguadora en PBS. Las auristatinas se pueden unir con un entrecruzador dipeptídico sensible a catepsina B, que se cliva ante la captación celular, o con un entrecruzador no clivable.

[0447] En el entrecruzador vcMonoMetilAuristatin, se une un adaptador dipeptídico de valina citrulina a la droga a través de un grupo a p-amino bencil carbamato (PAB) y al anticuerpo a través de una conjugación con caproil maleidimida. Ante la internalización, se cliva el entrecruzador dipeptídico a través de la proteasa lisosomal catepsina B, se autodestruye el grupo PAB, y se libera la toxina libre. Este entrecruzador se diseñó para mantener la estabilidad en suero a la vez que se maximiza la liberación intracelular de la droga mediante catepsina B.

[0448] Las auristatinas también se pueden unir a anticuerpos a través de entrecruzadores no clivables tales como MMAF directamente unidos al grupo de conjugación maleimido, con entrecruzador no sensible a peptidasa. Las ADC conjugadas con MC también son eficaces para matar células mediadas por objetivo.

[0449] El mecanismo de liberación de droga para los conjugados no clivables de auristatina se cree que es a través de degradación general del anticuerpo en los lisosomas. A través de estudios con LC/MS, se ha informado que los conjugados de Ab-mcMMAF liberan toxina en la forma de un aducto de cisteína simple.

Unión de conjugados de anticuerpo droga

[0450] Todos los conjugados de anticuerpo droga 5F9 se unieron a células 293-GCC#2 igualmente bien. La Tabla 10 muestra la intensidad media de fluorescencia de conjugados 5F9 para concentraciones crecientes de células 293-GCC#2. Otros estudios determinaron que el conjugado 5F9-SPDB-DM4 se unió células 293-GCC#2 en una forma dependiente de la concentración, mientras que el anticuerpo 209-SPDB-DM4 no se unió.

Tabla 13. Cuadro de MFIs de ensayos de unión de conjugados de 5F9 y 5F9 en células 293 GCC #2:

	µg/ml de conjugado de 5F9 o 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

[0451] Se ensayaron conjugados de toxina 5F9-auristatina en ensayos de citotoxicidad directa de una variedad de células que se han transfectado con ácido nucleico GCC y seleccionado para expresión de GCC. Un seguimiento del nivel de expresión superficial de GCC encontró que las células 293 GCC#2 expresan altas cantidades de GCC; las células HT 29 #2 y CT 26 #2.5 expresan GCC en niveles entre intermedio y bajos; las células CT 26 #32 expresan GCC a altos niveles; y HT 29 GCC #5 y HT 29 GCC #18 expresan bajas cantidades de GCC. La Tabla 11 muestra una compilación de múltiples estudios que rinden datos de toxicidad para los tres conjugados de auristatina en células que expresan el objetivo, o en células de tipo salvaje o células con vector control. Se observa una muerte potenciada por objetivo en todos los casos de toxinas conjugadas a 5F9 en células 293 GCC #2, con una ventana muy incrementada cuando se usa MMAF vs. MMAE. Tanto las formas clivables como no clivables de MMAF fueron potentes en forma similar. Como control negativo, también se hicieron conjugados de anticuerpo droga con anticuerpo sc209, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano hecho contra un objetivo no relacionado, sin reactividad a GCC. Los ensayos de toxicidad directa con 209 ADCs vs. 5F9 vcMMAF ADC mostraron muerte celular potenciada por objetivo en el modelo de células 293 y en el modelo de células HT29. Una comparación de la actividad de toxina conjugada con 5F9 entre las líneas celulares indica que el nivel de toxicidad tiene alguna correlación con la cantidad de GCC expresada por las células. Estos datos sugieren que al menos algunas líneas celulares, que expresan la mayor GCC, fueron más susceptibles a la actividad citotóxica del conjugado que lo que fueron las

células que expresan bajas cantidades de GCC. Véase el Ejemplo 1 para los números de GCC relativos por células. Otro factor en las diferencias de niveles de citotoxicidad pueden ser diferencias en procesos de internalización o procesamiento intracelular de los conjugados, que pueden variar entre líneas celulares de tipo salvaje.

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

	LD 50 (nM) conjugados de 5F9			LD50 (nM) de conjugados de 209
Línea celular	**vcMMAE**	**vcMMAF**	**mcMMAF**	
293 Vector	128	> 10	> 10	
293 GCC # 2	0,37	0,001	0,002	
293 Vector	1,8	>10	>10	
293 GCC # 2	0,13	0,005	0,007	
293 Vector		>10		>10
293 GCC # 2		0,0004		>10
HT 29 WT	84	> 10	> 10	
HT 29 GCC #2	24,1	0,127	3,1	
CT 26 WT	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #2,5	> 500	> 10	> 10	
CT 26 GCC #32	267	0,004	0,064	
HT 29 vector	520,6	> 10,000	> 10,000	

HT 29 GCC #5	653,5	563,2	> 10,000	
HT 29 GCC #18	554,6	> 10,000	> 10,000	
HT29	0,93	>10	>10	
HT29 GCC#5	0,59	0,32	>10	
HT29		>10		>10
HT29 GCC#5		0,035		>10

[0452] Si estas potencias se trasladan *in vivo*, con igual eficacia entre mc y vcMMAF, la mayor MTD predicha para mcMMAF sugeriría una mayor ventana terapéutica para este conjugado.

Maitansinas

[0453] Las ADC 5F9-maitansina mostraron una potente muerte potenciada por objetivo en las células 293-GCC#2 (Tabla 12). Interesantemente, los conjugados de 5F9-maitansina mostraron muerte potenciada por objetivo en el modelo 293, pero sin embargo no se observó muerte potenciada por objetivo en el modelo HT29, creando una preocupación con respecto a la utilidad de este modelo para la evaluación *in vivo* de los conjugados de maitansina. Otra vez, las razones para esta diferencia no son fácilmente explicables, pero se pueden atribuir a diferentes densidades de receptor y/o diferencias en la internalización o en el procesamiento de los conjugados dentro de las células. Como control negativo, también se hicieron conjugados de anticuerpo droga con anticuerpo sc209, que es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano contra un objetivo no relacionado, sin reactividad contra GCC. Los ensayos de citotoxicidad directa con ADCs 209 vs. ADCs 5F9 muestran muerte celular potenciada por objetivo en el modelo celular 293 con todos los conjugados de

5F9. En el modelo de células HT29, los conjugados 5F9-DMx y 209-DMx matan igualmente bien, lo que indica un mecanismo no específico de objetivo para la muerte en esas células.

Tabla 15 Citotoxicidad de ADCs de maitansina anti-GCC

	LD50 (nM)			
Línea celular	5F9-SMCC-DM1	209-SMCC-DM1	5F9-SPDB-DM4	209-SPDB-DM4
293 vector	25,3		10,4	
293 GCC#2	<0,004		<0,004	
293 vector	32	11	13	7,4
293 GCC#2	<0,000004	6,7	<0,000004	4,8
HT29	22,4		7,7	
HT29 GCC#5	20,8		9,1	
HT29	22	12	4,8	2,1
HT29 GCC#5	30	22	5,8	4,2

EJEMPLO 3: Evaluación *in vivo*

Modelos de tumor:

[0454] Se evaluaron las citotoxicidades *in vivo* de ADCs 5F9 en modelos de xenoinjerto en ratones. El trabajo inicial *in vivo* se hizo con las líneas celulares HT29-GCC#5 y #18. También se ensayó la línea celular 293-GCC#2 para crecimiento *in vivo* y se desarrolló como un modelo de trocar transplantable en forma serial.

[0455] Para responder a 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 de IHC de tejido xenoinjertado, tumores primarios de colon humano y metástasis. Se utilizó un panel de líneas celulares recientemente congeladas y tejidos para la cuantificación de GCC mediante rIHC con un mAb de ratón para GCC 3G1. Para la cuantificación por IHC, se hizo una puntuación usando un sistema de puntos semicuantitativo de entre 0 y 3. Si los niveles de GCC en modelo de tumor $\leq$ niveles de GCC clínicos, el modelado probablemente será preciso o se sobreestimará la exposición que se necesita clínicamente. Si los niveles de GCC en modelo de tumor > niveles de GCC clínicos, el modelado puede subestimar la exposición que se necesita clínicamente.

[0456] Mientras que hubo alguna variabilidad en la expresión de GCC en las muestras metastásicas, la expresión por parte de las células HT29-GCC#5 y #18 estuvo en el rango de muchas de las muestras metastásicas. Mediante IHC, la tinción de GCC en las células HT29-GCC#5 y #18 fue equivalente o menor que las células metastásicas. Estos datos sugieren que los modelos de tumores de los inventores expresan GCC a niveles comparables a los niveles que se encuentran en las muestras clínicas de metCRC.

[0457] La Tabla 16 representa los conteos de centelleo para diferentes tejidos cosechados en el punto de tiempo de 192 horas con representación de promedios para tres animales. 5F9 se acumuló preferencialmente en tumores HT29-GCC#5 vs. tumores de vector HT29, mientras que 209 no mostró mucha acumulación diferencial. Este resultado proveyó apoyo para que se pudiera esperar que los conjugados de anticuerpo droga 5F9 se acumulen en tumores que expresen GCC. En todos los otros tejidos que se evaluaron, hubo poca diferencia en los niveles de acumulación de 5F9 vs. anticuerpo mAb 209.

Distribución In vivo de 5F9 radiomarcado en ratones portando tumores de HT29-GCC#5 & vector HT29

[0458] Se llevó a cabo un estudio de radioimágenes en ratones portadores de tumores para evaluar el direccionamiento hacia los tumores y la biodistribución *in vivo* del anticuerpo anti-GCC 5F9 y un anticuerpo control negativo sc209 (anticuerpo monoclonal IgG1 humano contra un objetivo de superficie celular no relacionado). Los anticuerpos se radiomarcaron con ^{111}In usando DTPA como quelante bifuncional. Se investigó el comportamiento *in vivo*, incluyendo el direccionamiento hacia los tumores y la biodistribución en tejidos normales a lo largo del tiempo, con un modelo de tumor murino dual tanto con tumores GCC(-) como GCC(+). Se adquirieron imágenes *in vivo* (SPECT/CT), y se usó el conteo de radiactividad de tejido para suplementar la resolución espacial.

[0459] Se crecieron tumores subcutáneos en ratones *nude*, con tumores de vector HT29 a la derecha y tumores HT29-GCC#5 a la izquierda. Se dosificaron anticuerpos a 0,3 mCi = 15 µg por animal. Hubo tres animales por grupo, y los grupos se cosecharon a 1 hora, 24 horas, 48 horas, 72 horas, 120 horas y 192 horas.

[0460] Un examen de los tejidos de los animales en el grupo de 192 horas indicó que tanto 5F9 como 209 se acumularon en un grado similar en la mayoría de los tejidos normales (por ejemplo, sangre, corazón, estómago, intestino delgado, intestino grueso, musculo y piel) y en tumores de vector HT29. Ab 209 se acumuló a niveles algo mayores que 5F9 en hígado y 5F9 se acumuló a niveles algo mayores que 209 en pulmones, bazo y riñones. En los tumores HT29-GCC#5, 5F9 preferentemente se acumuló a niveles más de dos

veces mayores que los niveles de 209. Este resultado proveyó soporte para que se pudiera esperar que los conjugados de anticuerpo droga 5F9 se acumulen en tumores que expresan GCC.

[0461] Para entender la cinética de acumulación de anticuerpo en los tumores, se obtuvieron los datos de tumor para cada anticuerpo para todos los puntos de tiempo a lo largo de este estudio. El único tejido que mostró acumulación es el anticuerpo 5F9 en el tumor que expresa GCC. El nivel de radiactividad en todos los otros tejidos se mantuvo relativamente igual, con poca diferencia entre los niveles de 5F9 y los niveles de 209. 5F9 preferentemente se acumuló en tumores HT29-GCC#5, mientras que 209 no mostró ninguna acumulación. Este resultado proveyó soporte para que se pudiera esperar que el conjugado de anticuerpo droga 5F9 se acumula en tumores que expresan GCCs.

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

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

[0462] La acumulación de 5F9 radiomarcado en tumores que expresan GCCs a lo largo de 7 días apoyó un esquema de dosificación de una vez por semana.

Estudios de eficacia pilotos en tumores HT29-GCC#5 s.c.

[0463] Se llevaron a cabo estudios para determinar la eficacia de los conjugados y los regímenes de dosificación en ratones portadores de tumores HT29-GCC#5. Se dosificaron los ratones con dosis individuales o múltiples. Estos estudios determinaron que hubo toxicidad en dosis demasiado frecuentes a mayores niveles de conjugado de toxina (por ejemplo, 150 µg/kg de 5F9vcMMAF en esquema de q3d x 5). Otro estudio determinó que el esquema q14d x 5 era demasiado infrecuente en este modelo para permitir que

algunos conjugados de toxina muestran eficacia significativa vs. controles. Además, un estudio PD con conjugados de maitansinoide-anticuerpo en este modelo demostró acumulación de fosfohistona dependiente de la dosis solo con la toxina DM4, pero no con la toxina DM1. Otro estudio en este modelo mostró algo de inhibición del crecimiento tumoral por parte del conjugado de toxina no específico 209. Estos resultados sugieren que se necesitan evaluar otros modelos *in vivo*.

Estudio PK/PD con ADCs 5F9 en ratones portadores de tumores 293-GCC#2.

[0464] Un modelo de tumor alternativo usó células 293-GCC#2. Se llevó a cabo un estudio PD para ADCs de 5F9 en ratones portadores de tumores 293-GCC#2. Se dosificó a los ratones con dosis individuales de 5F9vcMMAF a 75 µg/kg o 150 µg/kg y se tomó suero en los puntos de tiempo entre 1 hora y 4 días para análisis de PD de fosfohistona H3 para ensayar los efectos antimitóticos de la toxina sobre células tumorales. Se detectó fosfohistona H3 mediante tinción con anticuerpo (Upstate Biotechnology, ahora Millipore, Billerica, MA) de secciones de tumores embebidas en parafina. Los datos de la Tabla 17 muestra que cada uno de los ADCs causó un incremento significativo de la población celular positiva a pH3 en los tumores lo que indica que cada uno de ellos, tanto a 75 como a 150 µg/kg de equivalentes de dosis de toxina fue capaz de alcanzar los tumores y de tener el efecto antimitótico deseado sobre las células tumorales.

Tabla 17. La respuesta PD determinada mediante arresto de células en mitosis (% de células tumorales positivas a pH3) luego de una dosis iv individual de ADCs de 5F9.

	Promedio de % células tumorales positivas a pH3	SD
Control de vehículo	2,556801	2,37707
5F9-vcMMAE 75 µg/kg 1 hora	4,525187	0,178882
4 horas	2,551616	1,688255
8 horas	4,243988	0,352938
24 horas	9,8199	4,82057
48 horas	8,692061	4,756786
96 horas	8,628345	1,065456
5F9-vcMMAE 150 µg/kg 1 hora	3,334943	1,351667
4 horas	2,78543	1,690216
8 horas	4,575611	1,130484
24 horas	13,78776	3,343155
48 horas	14,26067	5,448921
96 horas	14,67942	1,827724
5F9-vcMMAF 75 µg/kg 1 horas	4,235245	0,617585
4 horas	4,18364	0,846752
8 horas	4,930098	0,54746
24 horas	20,22484	2,453935

48 horas	9,920771	3,788795
96 horas	10,38187	1,896461
5F9-vcMMAF 150 µg/kg 1 horas	3,465674	1,341187
4 horas	4,416646	0,807636
8 horas	8,594385	4,005021
24 horas	21,53718	7,25212
48 horas	15,15814	4,28407
96 horas	11,12288	2,150476
5F9-mcMMAF 75 µg/kg 1 horas	5,365582	1,14198
4 horas	4,044478	0,992449
8 horas	8,228597	3,098222
24 horas	14,10734	1,611093
48 horas	19,37223	8,146504
96 horas	7,749388	1,180759
5F9-mcMMAF 150 µg/kg 1 horas	3,212482	0,509604
4 horas	4,722554	1,577531
8 horas	9,105349	5,963128
24 horas	27,51416	10,96057
48 horas	13,34043	3,414961
96 horas	15,60917	3,386154

[0465] Estudios similares midieron los niveles de fosfohistona en ratones portadores de tumores 293-GCC#2 tratados con 5F9vcMMAF, 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1. Se dosificó a los ratones con dosis individuales a 150 µg/kg y se tomó suero en los puntos de tiempo entre 1 hora y 21 días para análisis de PK tanto de anticuerpo total como anticuerpo conjugado a toxina. El porcentaje de células positivas a fosfohistona H3 en tumores 293-GCC#2 se incrementó en respuesta a los tres ADCS: 5F9vcMMAF, 5F9-SMCC-DM1 y 5F9-SPDB-DM4. Los niveles máximos de fosfohistona H3 fueron entre 3 y 5 veces mayores que la línea de base, con picos a las 24 horas después de la inyección.

Estudio de eficacia con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores 293-GCC#2 s.c.

[0466] Se ensayaron 5F9-SPDB-DM4, 5F9-SMCC-DM1 y 5F9vcMMAF para ver su eficacia en el modelo de tumor 293-GCC#2 a dos dosis (75 µg/kg y 150 µg /kg de toxina), en un esquema q14d x 5. Específicamente, este estudio incluyó control tratado con vehículo, Sc209-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), Sc209-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg equivalentes de MMAF), 5F9-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM1 (75 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), 5F9-DM4 (75 µg/kg equivalentes de DM4), 5F9-vcMMAF (150 µg/kg equivalentes de MMAF), y 5F9-vcMMAF (75 µg/kg equivalentes de MMAF). Se usaron ratones hembras de Taconic portando células 293-GCC#2 (10 ratones por grupo).

[0467] La Figura 1 muestra el crecimiento tumoral en ratones SCID portadores de 293-GCC#2 tratados con 5F9vc-MMAF, -DM1, y -DM4 en un esquema

q14d. Se observó eficacia dependiente de la dosis con 5F9-SPDB-DM4 en el modelo 293-GCC#2, mientras que el control 209-SPDB-DM4 no tuvo efecto. 5F9-SMCC-DM1 también fue eficaz, aunque menos que 5F9-SPDB-DM4 y 150 µg/kg. 5F9vcMMAF (75 µg/kg y 150 µg/kg) fue el más eficaz, sin embargo 209vcMMAF también tuvo algo de actividad. Por lo tanto, a todas estas dosis y esquemas, 5F9-SPDB-DM4 tuvo el mayor diferencial de eficacia comparado con su conjugado control.

Estudio de eficacia con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores 293-GCC#2 s.c.

[0468] Se ensayaron 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1 para eficacia en modelo de tumor 293-GCC#2 a dos dosis (75 µg/kg y 150 µg/kg de toxina) en un esquema q7d x 5. Específicamente, este estudio incluyó control tratado con vehículo, 5F9 solo (15 mg/kg), DM1 (300 µg/kg), DM4 (300 µg/kg), Sc209-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), Sc209-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg equivalentes de MMAF), 5F9-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM1 (75 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), y 5F9-DM4 (75 µg/kg equivalentes de DM4). Se usaron ratones hembra de Taconic portadoras de células 293-GCC#2 (10 ratones por grupo).

Eficacia de estudio con conjugados de auristatina en tumores 293 GCC#2

[0469] Se trataron ratones SCID portadores de tumores 293 GCC#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 toxinas libres o con control de vehículo. Se administraron las dosis iv en un esquema q7d x 4. Se

cosecharon los tumores en los días 3, 7, 10, 13 y 17. Los tumores en ratones tratados con reactivos de control demostraron un incremento continuo de volumen. Los tumores tratados con conjugados de auristatina 5F9 mostraron inhibición dependiente de la dosis y del tiempo de este crecimiento tumoral. La Tabla 18 provee 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 p = medida para juzgar significancia estadística, NS= no significativo).

Tabla 18. Análisis de ADCs de Auristatina en ratones portadores de tumores 293 GCC#2.

Grupos	TGI	T/C	TGD	CR/PR	Valor 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

[0470] Los tres de estos ADCs fueron eficaces en el modelo 293 GCC#2 en un esquema q7d. 5F9-vcMMAF y 5F9-mcMMAF son más potentes que 5F9-vcMMAE, lo que se correlaciona con los datos de citotoxicidad de PD (pHisH3) *in vivo* e *in vitro*.

Eficacia de estudio con 5F9vcMMAF y 5F9-DMx en tumores T84 s.c.

[0471] Se ensayaron 5F9-SPDB-DM4 y 5F9-SMCC-DM1 para eficacia en el modelo de tumor T84 a dos dosis (75 µg/kg y 150 µg/kg de toxina) en un esquema q7d x 5. Específicamente, este estudio incluyó control tratado con vehículo, 5F9 solo (15 mg/kg), DM1 (300 µg/kg), DM4 (300 µg/kg), Sc209-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), Sc209-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), Sc209-vcMMAF (150 µg/kg equivalentes de MMAF), 5F9-DM1 (150 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM1 (75 µg/kg equivalentes de DM1), 5F9-DM4 (150 µg/kg equivalentes de DM4), y 5F9-DM4 (75 µg/kg equivalentes de

DM4). Se usaron ratones hembras de Taconic portadoras de células T84 (10 ratones por grupo).

Inmunohistoquímica

[0472] La detección y medida de cantidades relativas de GCC en tejidos tales como biopsias y xenoinjertos se puede llevar a cabo mediante inmunohistoquímica. Se fijan las secciones de tejido congelado en una solución 1:1 de acetona y metanol durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se lavan los cortes en 1 x PBS durante 5 minutos. Se procesan los cortes en un dispositivo de tinción automático, tal como equipo de tinción automática Ventana Discovery XT (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ) usando la solución amortiguadora sugerida por los fabricantes. Se diluyen los anticuerpos anti-GCC a 5 µg/ml en suero de cabra al 5%. Para los anticuerpos anti-GCC humanos, por ejemplo, 5F9, el anticuerpo secundario de detección es una solución 1:500 de anticuerpo de cabra anti-humano biotinilado en bloque Dako Protein (Dako, Carpinteria, CA). Luego del proceso de tinción automática de la reacción de anticuerpo, se sacan los cortes del equipo de tinción automática, se lavan en solución amortiguadora de reacción, se deshidratan a través de series estándar hasta xileno y se ponen cubreobjetos con un medio montado a base de xileno.

Estudio de eficacia de ADCs en un modelo de tumor primario

[0473] Se desarrollan modelos de carcinoma colorectal primario y cáncer gástrico como tumores subcutáneos en ratones. Se ensayan ADCs 5F9-vcMMAE y 5F9-mcMMAF en ratones portadores de tumor primario PHTX-11c. Se administran dosis iv en un esquema q7d x 4. Se administran conjugados de toxinas con 209 a ratones control.

Actividad Antitumoral de ADCs en un modelo de tumor primario

[0474] 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 con toxina libre MMAE y con conjugado de anticuerpo toxina vcMMAE no inmune (209-vcMMAE) en ratones con xenoijerto de tumor de colon humano primario PHTX-9c a diferentes dosis y esquemas de dosificación y para determinar la cinética de recrecimiento después del tratamiento. Se inocularon subcutáneamente (SC) ratones hembra CB-17 SCID (ocho semanas de edad) en el flanco con fragmentos de tumor PHTX-9c (2 mm x 2 mm). Se monitoreó el crecimiento tumoral dos veces por semana usando calibres con vernier y se calculó el volumen medio de tumor usando la fórmula (0,5 × [longitud × ancho^2]). Cuando el volumen medio de tumor alcanzó aproximadamente 150 mm^3 (Estudio A) o 160 mm^3 (Estudio B), se mezclaron los animales al azar en grupos de tratamiento (n = 10/ grupo para Estudio A y n = 9/ grupo para Estudio B).

[0475] Se trataron los ratones (Estudio A) una vez con un esquema de dosificación 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 (0,9% de solución salina), 0,075 o 0,15 mg/kg de MMAE IV en un esquema QW, o 1,875 o 3,75 mg/kg de 209-vcMMAE IV en esquemas de dosificación 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 en un esquema QW (3 dosis) o 3,75 mg/kg IV en un esquema de dos veces por semana (BIW) (6 dosis), o controles incluyendo vehículo, 7,5 o 10 mg/kg de 209-vcMMAE, o 0,135 o 0,18 mg/kg de

MMAE administrado IV en un esquema QW durante 20 días. Se administraron las dosis en los días 1, 8, y 15 para el esquema QW y en los días 1, 4, 8, 11, 15, y 18 para el esquema BIW. Se calculó la dosis de MMAE libre para coincidir con la cantidad de MMAE en la dosis de inmunoconjugado mediante el siguiente razonamiento: La dosis equivalente de MMAE es 1,8% de la dosis de MLN0264. La dosis equivalente del entrecruzador + MMAE es 4% de la dosis de 5F9-vcMMAE. Estos cálculos se basan en un promedio 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 levemente debido al grado de glicosilación.

[0476] Se midieron el volumen de tumor y el peso corporal dos veces por semana y se continuaron después del periodo de tratamiento para medir las cinéticas de recrecimiento, evidenciadas por el retraso de crecimiento tumoral (TGD). Se continuaron las medidas de volumen de tumor hasta que el volumen del tumor alcanzó el 10% del peso corporal de un ratón individual dentro de un grupo de tratamiento, momento en el cual se terminó el grupo. Se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento tumoral (TGI) ([volumen medio de tumor del grupo control – volumen medio de tumor del grupo tratado] / volumen medio de tumor del grupo control; proporción T/C) en el día 20, se compararon las proporciones T/C para el grupo de tratamiento con las proporciones T/C del grupo control usando una prueba de Welch de dos colas. Debido a que se terminaba el grupo entero si un tumor alcanzaba el tamaño límite (aproximadamente 1000 mm^3), no se pudo calcular TGD para los grupos en donde el recrecimiento promedio fue lento.

[0477] Se determinaron las diferencias de tendencia de crecimiento tumoral en el tiempo entre pares de grupos de tratamiento usando modelos de regresión de efectos mezclados lineales. 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 (AUC) para cada grupo de tratamiento usando los valores predichos por el modelo. Luego se calculó el porcentaje de disminución de AUC (dAUC) en relación al grupo de referencia. Un valor *P* estadísticamente significativo (< 0,05) sugiere que las tendencias en el tiempo para los dos grupos de tratamiento fueron diferentes. Los resultados se resumen en las Tablas 19 y 20, más adelante.

[0478] Se observó actividad antitumoral en todos los grupos tratados con 5F9-vcMMAE en ambos estudios y el efecto demostró ser dependiente de la dosis. Los resultados de los dos estudios fueron comparables. En ratones tratados con 5F9-vcMMAE a 0,938 mg/kg, IV en un esquema QW, la TGI fue entre 20,7 y 21,4%, el valor p fue de <0,05 en comparación con el grupo vehículo. En el grupo tratado con 1,875 mg/kg administrado IV, en un esquema QW la TGI fue entre 41,3 y 44.7%, el valor p fue de <0,001. En el grupo tratado con 3,75 mg/kg administrado IV, en un esquema QW la TGI fue de entre 65,3 y 65,7% (p <0,001) en comparación con el grupo de vehículo. 5F9-vcMMAE administrado a 7,5 mg/kg IV QW rundió una TGI de entre 84,1 y 84,3% (p<0,001) y 10 mg/kg IV QW (Estudio B solo) rindió una TGI de 91,2% (p<0,001). Cuando se administró 3,75 mg/kg administrado IV en un esquema BIW (S), se observó una inhibición significativa con una TGI de entre 84,9% (p<0,001).

[0479] Se observó actividad antitumoral moderada a dosis mayores de 209-vcMMAE de entre 7,5 y 10,0 mg/kg con TGI de 35,7 y 45,4%, respectivamente ($p<0,001$) pero las dosis menores de 209-vcMMAE (1,875 y 3,75 mg/kg) no mostraron inhibición ($p>0,05$). La actividad antitumoral que se observó por parte de 209-vcMMAE probablemente sea debida a actividad no específica por parte de la porción MMAE del inmunoconjugado.

[0480] La administración de toxina libre MMAE rindió resultados mixtos: 0,075, 0,135, y 0,15 mg/kg administrado IV QW no rindieron inhibición de crecimiento tumoral ($p>0,05$) pero la administración de 0,18 mg/kg IV QW resultó en una TGI de 50,4% ($p<0,001$).

[0481] La máxima pérdida de peso corporal que se observó durante el periodo de tratamiento fue de 2,3% en el día 7 en el grupo con toxina libre de 0,18 mg/kg de MMAE del Estudio B y en el grupo de 0,938 mg/kg de 5F9-vcMMAE del mismo estudio. Esto indica que la droga fue bien tolerada.

[0482] Se continuaron las medidas del volumen de tumor después del periodo de tratamiento hasta que el volumen tumoral alcanzó 10% del peso corporal en un animal individual dentro de un grupo de tratamiento y entonces se terminó el grupo de tratamiento. En estos estudios, el recrecimiento tumoral pareció ser dependiente de la dosis.

Tabla 19. Resultados de Estudio A de tratamiento de xenoinjerto de tumor de colon humano primario en ratones SCID.

Tratamiento	Dosis (mg/kg)	Método de administración/ frecuencia	TGI	Cambio de BW (media de	TGD (días) /(o días

				porcentaje máximo)	hasta primer tumor con >1000 mm^3)
Vehículo	0	IV QW × 3 dosis	N/A	-0,2	0
209-vcMMAE	1,875	IV QW × 3 dosis	-2,0 (p>0,05)	8,3	0,6
209-vcMMAE	3,75	IV QW × 3 dosis	4,5 (p>0,05)	6,9	0,4
MMAE	0,075	IV QW × 3 dosis	5,0 (p>0,05)	8,3	1,0
MMAE	0,15	IV QW × 3 dosis	11,1 (p>0,05)	10,8	2,0
5F9-vcMMAE	0,938	IV QW × 3 dosis	21,4 (p>0,05)	9,0	3,3
5F9-vcMMAE	1,875	IV QW × 3 dosis	44,7 (p>0,001)	10,6	8,2
5F9-vcMMAE	3,75	IV QW × 3 dosis	65,3 (p>0,001)	9,0	17,8
5F9-vcMMAE	7,5	IV QW × 3 dosis	84,1 (p>0,001)	7,5	(>58 días primer tumor)

Tabla 20. Resultados de Estudio B de tratamiento de xenoinjerto de tumor de colon humano en ratones SCID.

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

5F9-vcMMAE	3,75	IV QW × 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 × 3 dosis	84,3 (p>0,001)	6,5	(>47 días primer tumor)
5F9-vcMMAE	10,0	IV QW × 3 dosis	91,2 (p>0,001)	7,2	(>56 días primer tumor)

Eficacia de estudio piloto con anticuerpo anti hGCC 5F9 desnudo en modelo diseminado CT26 hGCC/luc #32 (ratones balb/c)

[0483] Este modelo prueba la habilidad de anticuerpos desnudos para unirse a células tumorales que expresan GCC en la circulación y para prevenir el establecimiento de nuevos tumores. Se inocularon ratones balb/c hembra mediante i.v. con células CT26 hGCC/luc #32 a $1x10^5$/ratón y $5x10^5$/ratón. Se administraron vehículo de 0,9% de NaCl y anticuerpo no específico (209 desnudo) a grupos control para comparación con la administración de 5F9 desnudo. Ambos anticuerpos fueron modificados genéticamente (en el vector pLKTOK58) para tener isotipo IgG1, de modo que sus regiones Fc pudieran producir una respuesta citotóxica mediada por células dependiente de anticuerpo después de unirse a los antígenos de superficie celular (o sea, GCC para 5F9 y un objetivo no relacionado para 209). Se comenzó con las dosificaciones en el día antes de la inoculación mediante i.v, con un esquema de dosificación de una vez/semana i.v x4 (q7d x 4). Se monitoreó el crecimiento

tumoral mediante sistema de imágenes Xenogen dos veces por semana. También se monitorearon el peso corporal y la sobrevida dos veces por semana. Se tomaron peso e imágenes de pulmones incluyendo imágenes MRI al final de este estudio.

[0484] Como se muestra en la Figura 2, ambos grupos 5F9 (40 mg/kg y 10 mg/kg; $1x10^5$/ratón) mostraron eficacia (en el día 34 p.i: T/C (tratamiento/control) es entre 0,04 y 0,05). T/C para el grupo 5F9 es entre 0,18 y 0,14 en el día 34 p.i en comparación con el grupo 209. T/C para el grupo de 209 de 40 mg/kg es de 0,64 en comparación con el grupo de 0,9% de NaCl (Solución Salina Normal). No se observaron beneficios con 5F9 en los grupos de $5x10^5$.

[0485] En la Figura 3 se mostró el peso de pulmón de cada grupo al final de este estudio. prueba T: vehículo vs. 40 mg/kg de 209 P= 0,4; vehículo vs. 40 mg/kg de 5F9 P<0,05; vehículo vs. 10 mg/kg de 5F9P <0,01. La inspección visual de los pulmones confirmó menos nódulos tumorales en los grupos tratados con 5F9 que en los grupos tratados con vehículo o con 209. Un MRI *In vivo* de los ratones mostró una exfiltración tumoral pulmonar masiva a tejidos circundantes y desplazamiento de corazón en ratones tratados con vehículo. En un ratón tratado con 40 mg/kg de 5F9, se vio una presentación de pulmón normal sin evidencias de tumor.

[0486] En la Figura 4 se muestra una curva de sobrevida. Se observó un incremento significativo de la sobrevida con los grupos tratados con 5F9 ($1x10^5$) y no hubo diferencia entre los grupos de 10 y 40 mg/kg de 5F9.

EJEMPLO 4: Generación de una línea de producción de anticuerpo

[0487] Para generar un clon de línea de células CHO que exprese 5F9 con una productividad de >600mg/L, se generaron vectores de expresión para 5F9 mediante subclonado de la región variable de cadena liviana variable (SEQ ID NO:19) y la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO:17) en el vector de expresión pLKTOK58, con Fc de IgG1 humana WT y el gen de resistencia a neomicina. La expresión del producto fusión de región variable de 5F9 e IgG1 está bajo el control del promotor EF-1a.

Clonado y secuenciación de las regiones variables del anticuerpo monoclonal humano anti-GCC 5F9

[0488] Se aisló ARN total (conjunto de componentes Qiagen's RNeasy) del subclon 8.2 de hibridoma humano 46.5F9. Este hibridoma porta la región constante Kappa publicada "estándar" de la cadena liviana (GenBank acceso # AW383625, o BM918539) y la región constante publicada "estándar" de IgG2 de la cadena pesada (acceso GenBank # BX640623, o AJ294731). Se sintetizó ADNc con cola de poli-G listo para race en 5' mediante métodos tradicionales (Nature Methods 2, 629-630 (2005)). Se amplificó la región variable de la cadena liviana mediante PCR a partir del ADNc mediante la técnica de *race* en 5' usando un oligo de anclaje de poli-C en combinación con un cebador reverso específico para la región constante Kappa. Se amplificó la región variable de cadena pesada con un cebador reverso específico para la región constante de IgG2 en múltiples combinaciones con cebadores directos de las secuencias conocidas líder de cadena pesada. Los productos de PCR se clonaron en TOPO® (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) y se secuenciaron con cebadores M13F y M13R.

Construcción de vectores de expresión mamíferos portando anticuerpo monoclonal humano anti-GCC 5F9

[0489] Se construyeron vectores de expresión mamíferos con las regiones variables de cadena liviana y pesada de 5F9 para generar líneas de células para CHO de producción. Para la construcción nativa, se subclonaron las regiones variables de las cadenas liviana y pesada de 5F9 en pLKTOK58D (Solicitud de Patente de los EE.UU. # 20040033561). Este vector porta dos marcadores de selección mamíferos: resistencia a neomicina y DHFR/metotrexato (para amplificación). El vector permite la coexpresión tanto de la cadena liviana como pesada a partir de promotores EF1alpha en tándem, cada uno localizado corriente arriba de las regiones constantes líder Kappa y líder IgG1 (Fc de tipo salvaje) del vector. Para el subclonado, las regiones variables de las cadenas liviana y pesada se amplificaron por PCR a partir de los clones TOPO confirmados por secuencia con cebadores específicos de gen conteniendo sitios de restricción únicos para clonado direccional en las uniones de las respectivas regiones líder Kappa y líder IgG1 del vector. Las secuencias de los cebadores son como sigue (secuencias especificas de región variable de 5F9 en fuente negrita):

Cebadores de región variable líder de cadena liviana nativa de 5F9:

directo NotI

5'*ataagaatGCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCT TCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCC***GAAATAGTGATGACGCAG TCTCCAGCCACCCTG**-3' (SEQ ID NO: 234)

reverso BsiWI

5'-

*GCCACCGTACG***TTTGATTTCCACGTTGGTCCCTTGGCCGAACGTC**-3' (SEQ ID NO:235)

Cebadores de región variable líder de cadena pesada nativa de 5F9 cadena pesada

directo EcoRI

5'ccgGAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCA ACAGCTACAGGTGTCCACTCC**CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAG GAC**-3' (SEQ ID NO:236)

reverso BlpI

5'-

GGAGGCTGAGC**TGACGGTGACCAGGGTTCCCTGGCCCCAGTGGTC**-3' (SEQ ID NO: 237)

[0490] Los clones se confirmaron mediante secuenciación del ADN de doble cadena tanto para la cadena liviana como pesada.

[0491] Se usaron dos métodos de transfección para introducir las construcciones en las células CHO: el proceso MPI tradicional y el proceso Crucell. Las transfecciones de las células CHO se iniciaron con la construcción nativa de 5F9 usando el proceso tradicional MPI. Se usaron ADNs lineales y no lineales, ya sea con electroporación o transfección con Lipopfectamine 2000 CD. Se generaron aproximadamente 30 grupos estables a través de selección en G418, medio sin nucleósidos y metotrexato 5 nM. En base a análisis FMAT de los niveles de producción de anticuerpo, se eligieron tres grupos estables para clonado. El grupo con la producción más grande secretó anticuerpo a 12 µg/ml. Estos tres grupos se han almacenado por congelación.

[0492] Se pueden evaluar los elementos Crucell STAR para hacer vectores de expresión de 5F9 con un elemento STAR.

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

GAATTCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGC
AACAGCTACAGGTGTCCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCA
GGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCGCTGTCTTTGG
TGGGTCTTTCAGTGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAGGGA
AGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCAATCATCGTGGAAACACCAACGAC
AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAA
CCAGTTCGCCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTTT
ATTACTGTGCGAGAGAACGTGGATACACCTATGGTAACTTTGACCACTGGG
GCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATC
GGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCG
GCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT
CGTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGT
CCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCC
AGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACT
CACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAG
TCTTCCTCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGT
CAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAA
AGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCT
CACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAG
GTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGC

CAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGG
GATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTT
CTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG
AACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTT
CCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAC
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATAATAGGGATAACAGGGTAATA
CTAGAG

(SEQ ID NO:230)

La secuencia proteica de la cadena pesada de 5F9/hIgG1 es;

MGWSCIILFLVATATGVHSQVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVFGGSF
SGYYWSWIRQPPGKGLEWIGEINHRGNTNDNPSLKSRVTISVDTSKNQFALKL
SSVTAADTAVYYCARERGYTYGNFDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K

(SEQ ID NO:231)

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

GCGGCCGCCTCACCATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGT
AGCAACAGCTACAGGTGTCCACTCCGAAATAGTGATGACGCAGTCTCCAG
CCACCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCC

AGTCAGAGTGTTAGCAGAAACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCA
GGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCACCAGGGCCACTGGAATCC
CAGCCAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGAGTTCACTCTCACCATC
GGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTATAAA
ACCTGGCCTCGGACGTTCGGCCAAGGGACCAACGTGGAAATCAAACGTAC
GGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGA
GGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCC
AGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG
CAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACG
CCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC
AACAGGGGAGAGTGTTAGTCTAGA

(SEQ ID NO:232)

La secuencia de proteínas de la cadena liviana de 5F9/hKappa es:

MGWSCIILFLVATATGVHSEIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVS
RNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTIGSLQSEDF
AVYYCQQYKTWPRTFGQGTNVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL
NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SEQ ID NO:233)

[0493] Las secuencias de ácidos nucleicos de cadena pesada y liviana para 5F9 que se listan más abajo se insertaron en el vector pTOK58D:

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagctacaggtgtccactccgaaatagtgatg
acgcagtctccagccaccctgtctgtgtctccagg

ggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagaaacttagcctggtatcagca
gaaacctggccagg

ctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggaatcccagccaggttcagtggcag
tgggtctgggaca

gagttcactctcaccatcggcagcctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcagcagtataaaa
cctggcctcg

gacgttcggccaagggaccaacgtggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttc
ccgccatctgatg

agcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaag
tacagtggaag

gtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggaca
gcacctacagcctcag

cagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacc
catcagggcctgagct

cgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:308)

atgggatggagctgtatcatcctcttcttggtagcaacagct

acaggtgtccactcccaggtgcagctacagcagtggggcgcaggactgttgaagccttcggagac
cctgtccctcacctg

cgctgtctttggtgggtctttcagtggttactactggagctggatccgccagcccccagggaaggggct
ggagtggattg

gggaaatcaatcatcgtggaaacaccaacgacaacccgtccctcaagagtcgagtcaccatatca
gtagacacgtccaag

aaccagttcgccctgaagctgagttctgtgaccgccgcggacacggctgtttattactgtgcgagaga
acgtggatacac

ctatggtaactttgaccactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaaggg
cccatcggtcttcc

ccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaaggact
acttccccgaaccg

gtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagt
cctcaggactcta

ctccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtg
aatcacaagccca

gcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccacc
gtgcccagcacctgaa

ctcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgga
cccctgaggtcac

atgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgt
ggaggtgcataatg

ccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgt
cctgcaccaggactgg

ctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagccccatcgagaaaa
ccatctccaaagccaa

agggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaa
ccaggtcagcctgacct

gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggag
aacaactacaagacc

acgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagca
ggtggcagcaggg

gaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctcc ctgtctccgggta

aataa (SEQ ID NO:309)

[0494] Las secuencias que codifican para las cadenas pesada y liviana de Abx-229 que se listan a continuación se insertaron en el vector pTOK58D:

atggagtttgggctgagctggctttttcttgtggctatt

ttaaaaggtgtccagtgtgaggtgcagctgttggagtctgggggaggcttggtacagcctgggggt ccctgagactctc

ctgtgcagcctctggattcacctttagccgctatgccatgaactgggtccgccaggctccagggaagg ggctggagtggg

tctcaggtattagtgggagtggtggtaggacatactacgcagactccgtgaagggccggttcaccat ctccagagacaat

tccaagaacacactatatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgt gcgaaagatcgcga

tttttggagtggtccatttgactactggggccagggaaccctggtcaccgtcagctcagcctccaccaa gggcccatcgg

tcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctggtcaa ggactacttcccc

gaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtc ctacagtcctcagg

actctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagacctacatctgc aacgtgaatcaca

agcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatg cccaccgtgcccagca

cctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctc
ccggacccctga

ggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtgga
cggcgtggaggtgc

ataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcct
caccgtcctgcaccag

gactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcga
gaaaaccatctccaa

agccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgac
caagaaccaggtcagcc

tgacctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagc
cggagaacaactac

aagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctacagcaagctcaccgtggaca
agagcaggtggca

gcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagag
cctctccctgtctc

cgggtaaataa (SEQ ID NO:310)

atgaggctccctgctcagcttctc

ttcctcctgctactctggctcccagataccactggagaaatagtgatgacgccgtcttcagccaccctg
tctgtgtctcc

aggggagagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagtagaaacttagcctggtacca
gcagaaacctggcc

aggctcccaggctcctcatctatggtgcatccaccagggccactggtatcccagccaggttcagtgg
cagtgggtctggg

acagaattcactctcaccatcagcagcctgcagtctgaagattttgcagtttattactgtcaccagtata
gtaactggat

gtgcagttttggccaggggaccaagctggagatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatctt
cccgccatctg

atgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggcca
aagtacagtgg

aaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaagg
acagcacctacagcct

cagcagcaccctgaccctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtc
acccatcagggcctga

gctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgttag (SEQ ID NO:311)

[0495] Mientras que esta invención se ha mostrado y descrito en referencia a formas de realización provistas en la presente, aquéllos con experiencia en el arte comprenderán que pueden ser posibles diversos cambios de forma y detalle sin alejarse del alcance de la invención abarcada por las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MILLENNIUM PHARMACEUTICALS, INC.
AMGEN BRITISH COLUMBIA

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

<130> M2051-7027WO

<140>
<141>

<150> 61/254,474
<151> 2009-10-23

<160> 319

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 348
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 1
caggtgcagc tgaaggagtc aggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60

acatgcactg tctctgggtt ctcattaagc agaaatgcta taagctgggt tcgccagcca 120

ccaggaaagg gtctggagtg gcttggagta atatggactg gtggaggcac aaattataat 180

tcagctctca aatccagact gagcatccgc aaagagaact ccaagagtca agttttctta 240

aaaatgaaca gtctacaaac tgaagacaca gccaggtact tctgtgccag aagtggttac 300

gacgggtttg attactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgca 348

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 2

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

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Arg Asn
20 25 30

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

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

Ser Arg Leu Ser Ile Arg Lys Glu Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 318
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 3
cagattgttc tcacccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcaccagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggtaacc cgtacacgtt cggaggggg 300

accaaactgg aaataaaa 318

<210> 4

<211> 106
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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

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

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

<400> 5
caggtccagt tgaagcagtc tggagctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg 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 gccaagggac tctggtcact gtctct 336

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

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

<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

<210> 7
<211> 336
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 7
gatgttgtga tgacccagac tccactgtct ttgtcggtta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttacaacaga ggcctggcca ggctccaaag cacctaatgt atcaggtgtc caaactggac 180

cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaag 336

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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

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

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

<400> 9
caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaagc ctggggcttc agtgcagatg 60

tcctgtaagg 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 tctggtcact gtctct 336

<210> 10

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 10

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

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

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

<400> 11
gatgttgtgt tgacccagac tccactcact ttgtcgatta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaaaaccta tttgagttgg 120

ttattacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc tcaactggac 180

tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggaa cagattttac actgaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tttgggagtg tattactgcg tgcaaggtac acatttattc 300

acgttcggct cggggacaaa gttggaaata aaa 333

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

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

<400> 12
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

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

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

<400> 13

caggtccagc 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 gccaagggac tctggtcact gtctctgca 339

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

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

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

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

<400> 15
gatgttgtga tgacccagac tccactgtct ttgtcggtta ccattggaca accagcctct 60

atctcttgca agtcaagtca gagcctctta tatagtaatg gaaagacata tttgaattgg 120

ttacaacaga ggcctggcca ggctccaaag cacctaatgt atcaggtgtc caaactggac 180

cctggcatcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcagaaa cagattttac acttaaaatc 240

agcagagtgg aggctgaaga tttgggagtt tattactgct tgcaaggtac atattatccg 300

tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa 336

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

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

<400> 16

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

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

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

<400> 17
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300

tacacctatg gtaactttga ccactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

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

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 18

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

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

<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 ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg aatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagag ttcactctca ccatcggcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag tataaaacct ggcctcggac gttcggccaa 300

gggaccaacg tggaaatcaa a 321

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

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

<400> 20
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

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

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

<400> 21

caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactgctaca tgagctggat ccgccagtct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtttcatac attactacta gtggtaatac catttactac 180

gcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagactgg 300

ggatggttct acggtatgga cgtctggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

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

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

<400> 22
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

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

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

<220>
<221> modified_base
<222> (216)..(217)
<223> a, c, t, g, unknown or other

<400> 23
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgca agtctagtca gagcctcctg cataatgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacaa ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc cagataggtt cagtagcagc gggtcnngga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acagcttcct 300

cggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

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

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

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

<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

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

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

<400> 25
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 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

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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

<210> 27
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 27
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagacttc taaccgcttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg gagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca 300

accttcggcc aagggacacg actggagatt aaa 333

<210> 28

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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

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

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

<400> 29
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 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

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

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

<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

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 31

gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

atctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacaccta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagacttc taaccgcttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg gagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac gcaatttcca 300

accttcggcc aagggacacg actggagatt aaa 333

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<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

<210> 33
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 33
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct 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

<210> 34
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

<210> 35
<211> 333
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 35
gatattgtga tgacccagac tccactctcc tcacctgtca cccttggaca gccggcctcc 60

ttctcctgca ggtctagtca aagcctcgta cacagtgatg gaaacacgta cttgagttgg 120

cttcagcaga ggccaggcca gcctccaaga ctcctaattt ataagatttc taaccggttc 180

tctggggtcc cagacagatt cagtggcagt ggggcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agcagggtgg aagctgagga tgtcggggtt tattactgca tgcaagctac acaatttcca 300

accttcggcc aagggacacg actggagatt aaa 333

<210> 36

<211> 111

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 36

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

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

<400> 37
caggtgcagc tggtggagtc tgggggaggc ttggtcaagc ctggagggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt gactactaca tgagctggat ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg gatttcatac attactagta gtggtagtac catatactac 180

tcagcctctg tgaagggccg attcaccatc tccagggaca acgccaagaa ctcactgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gagagatttc 300

agtggctggt tcggagtcca ctttgactac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 360

tcg 363

<210> 38
<211> 121
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 38
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

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

<400> 39
gatattgtga tgacccagac tccactctct ctgtccgtca cccctggaca gccggcctcc 60

atctcctgta agtctagtca gagcctcctg catagtgatg gaaagaccta tttgtattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gcctccacag ctcctgatct atgaagtttc caaccggttc 180

tctggagtgc caaataggtt cagtggcagc gggtcaggga cagatttcac actgaaaatc 240

agccgggtgg aggctgagga tgttggggtt tattactgca tgcaaagtat acaacttacg 300

tggacgttcg gccaagggac caaggtggaa atcaaa 336

<210> 40
<211> 112
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 41
<211> 354
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 41
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggactg ggtctcagat attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatgc acagcctgag cgccgaggac acggccatat attactgtgc gaaacggcgg 300

tggcaggggt acttcgatct ctggggccgt ggcaccctgg tcactgtctc ctca 354

<210> 42
<211> 118
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<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
<211> 324
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<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 caaa 324

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<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

<210> 45
<211> 360
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 45
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cgctatgcca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggga gtggtggtag gacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacactatat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300

gatttttgga gtggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

<210> 46
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 46
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

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa a 321

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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

<210> 49
<211> 351
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 49
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga 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 cgcggacacg gccgtgtatt tctgtgcgag agatagatat 300

tatggctacc ttgactactg gggccaggga accctggtca ccgtctcctc a 351

<210> 50
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 50
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

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

<400> 51
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 tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gttcaccgag caccttcggc 300

caagggacac gactggagat taaa 324

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polipéptido sintético

<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

<210> 53
<211> 342
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 53
caggtgcagc tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggcgg ctccatccgt cattactact ggagctggat ccggcagccc 120

ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atctattaca gtgggagcac caactacaac 180

ctctccctca agagtcgagt caccatatca agagacacgt ccaagaatca ggtctccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt attgtgcggc gggtatgggc 300

tttgactact ggggccaggg aaccctggtc accgtctcct ca 342

<210> 54
<211> 114
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

<210> 55
<211> 321
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Polinucleótido sintético

<400> 55

gacatccaga tgacccagtc tccttcctcc 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 tccctccgac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 56
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<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

<210> 57
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 57
agaaatgcta taagc 15

<210> 58
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 58

Arg Asn Ala Ile Ser

1 5

<210> 59

<211> 48

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 59

gtaatatgga ctggtggagg cacaaattat aattcagctc tcaaatcc 48

<210> 60

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 60

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
<213> Secuencia artificial

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

<400> 61
agtggttacg acgggtttga ttac 24

<210> 62
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 62
Ser Gly Tyr Asp Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 63
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 63
agtgccagct caagtgtaaa ttacatgcac 30

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 64
Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 65
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 65
gacacatcca aactggcttc t 21

<210> 66
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 66
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 67
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 67
cagcagtgga gtggtaaccc gtacacg 27

<210> 68
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 68
Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Tyr Thr
1 5

<210> 69
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 69
gactactata taaac 15

<210> 70
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 70
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 71
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 71
aagattggtc ctcgaagtgg taatacttac tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 72
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 73

<211> 12

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 73

tgggatgctt ac 12

<210> 74

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 74

Trp Asp Ala Tyr
1

<210> 75
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 75
aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat 48

<210> 76
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 76
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 77
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 77
caggtgtcca aactggaccc t 21

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 78
Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 79
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 79
ttgcaaggta catattatcc gtacacg 27

<210> 80
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 80
Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 81
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 81
ggctactgga tgtac 15

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 82
Gly Tyr Trp Met Tyr
1 5

<210> 83
<211> 51
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 83
aggattcatc cttctgatag taatactaac tacaatcaaa agttcaaggg c 51

<210> 84
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

Gly

<210> 85
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 85

gcccttgctt ac 12

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 86
Ala Leu Ala Tyr
1

<210> 87
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 87
aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaaaacct atttgagt 48

<210> 88
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 89

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 89

ctggtgtctc aactggactc t 21

<210> 90

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 90

Leu Val Ser Gln Leu Asp Ser
1 5

<210> 91

<211> 24

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 91
gtgcaaggta cacatttatt cacg 24

<210> 92
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 92
Val Gln Gly Thr His Leu Phe Thr
1 5

<210> 93
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 93
gactactata taaac 15

<210> 94
<211> 5

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 94
Asp Tyr Tyr Ile Asn
1 5

<210> 95
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 95
aagattggtc ctagaagtgg tagtacttac tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 96
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 96
Lys Ile Gly Pro Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 97
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 97
tgggatgctt ac 12

<210> 98
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 98
Trp Asp Ala Tyr
1

<210> 99
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 99

aagtcaagtc agagcctctt atatagtaat ggaaagacat atttgaat 48

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<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

<210> 101

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 101

caggtgtcca aactggaccc t 21

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 102
Gln Val Ser Lys Leu Asp Pro
1 5

<210> 103
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 103
ttgcaaggta catattatcc gtacacg 27

<210> 104
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 104
Leu Gln Gly Thr Tyr Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 105
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 105
ggttactact ggagc 15

<210> 106
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 106
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 107
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 107
gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag 45

<210> 108
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 108
Glu Ile Asn His Arg Gly Asn Thr Asn Asp Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 109
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 109
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

<210> 110
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 110

Glu Arg Gly Tyr Thr Tyr Gly Asn Phe Asp His
1 5 10

<210> 111
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 111
agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcc 33

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 113
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 113
ggtgcatcca ccagggccac t 21

<210> 114
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 114
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 115
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 115
cagcagtata aaacctggcc tcggacg 27

<210> 116
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 116
Gln Gln Tyr Lys Thr Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 117
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 117
gactgctaca tgagc 15

<210> 118
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 118
Asp Cys Tyr Met Ser
1 5

<210> 119
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 119
tacattacta ctagtggtaa taccatttac tacgcagact ctgtgaaggg c 51

<210> 120
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 120
Tyr Ile Thr Thr Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 121
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 121
gactggggat ggttctacgg tatggacgtc 30

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 122
Asp Trp Gly Trp Phe Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 123
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 123
aagtctagtc agagcctcct gcataatgat ggaaagacct atttg 45

<210> 124
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 124
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Asn Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 125
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 125
gaagtttcca accggttctc t 21

<210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 126
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 127

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 127
atgcaaagta tacagcttcc tcggacg 27

<210> 128
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 128
Met Gln Ser Ile Gln Leu Pro Arg Thr
1 5

<210> 129
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 129
agctatggca tgcac 15

<210> 130
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 130
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 131
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 131
gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 132
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 133
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 133
gggaggagca gctcgtactt tgactat 27

<210> 134
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 134
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 135
<211> 48

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 135
aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt 48

<210> 136
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 136
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

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

<400> 137
aagacttcta accgcttctc t 21

<210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 138
Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 139
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 139
atgcaagcta cgcaatttcc aacc 24

<210> 140
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 140
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr

1 5

<210> 141
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 141
agctatggca tgcac 15

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 142
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 143
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 143
gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagcct ccgtgaaggg c 51

<210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 144
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Ala Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 145
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 145
gggaggagca gctcgtattt tgactac 27

<210> 146

<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 146
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 147
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 147
aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacct acttgagt 48

<210> 148
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 148
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Ser
1 5 10 15

<210> 149
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 149
aagacttcta accgcttctc t 21

<210> 150
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 150
Lys Thr Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 151
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 151
atgcaagcta cgcaatttcc a 21

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 152
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 153
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 153
agctatggca tgcac 15

<210> 154
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 154
Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 155
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 155
gctatatggt atgatggaag taataaatac tatgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 156
Ala Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 157
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 157
gggaggagca gctcgtactt tgactat 27

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 158
Gly Arg Ser Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 159
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 159

aggtctagtc aaagcctcgt acacagtgat ggaaacacgt acttgagt 48

<210> 160
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 161
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 161
aagatttcta accggttctc t 21

<210> 162
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 162
Lys Ile Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 163
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 163
atgcaagcta cacaatttcc aacc 24

<210> 164
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 164
Met Gln Ala Thr Gln Phe Pro Thr
1 5

<210> 165
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 165
gactactaca tgagc 15

<210> 166
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 166
Asp Tyr Tyr Met Ser
1 5

<210> 167
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 167
tacattacta gtagtggtag taccatatac tactcagcct ctgtgaaggg c 51

<210> 168
<211> 17

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 169
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 169
gatttcagtg gctggttcgg agtccacttt gactac 36

<210> 170
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 171
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 171
aagtctagtc agagcctcct gcatagtgat ggaaagacct atttgtat 48

<210> 172
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 173
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 173
gaagtttcca accggttctc t 21

<210> 174
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 174
Glu Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 175
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 175
atgcaaagta tacaacttac gtggacg 27

<210> 176
<211> 9
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 176
Met Gln Ser Ile Gln Leu Thr Trp Thr
1 5

<210> 177
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 177
agctatgcca tgagc 15

<210> 178
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 178
Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 179
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 179
gatattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 180
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

Gly

<210> 181
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 181
cggcggtggc aggggtactt cgatctc 27

<210> 182
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 182
Arg Arg Trp Gln Gly Tyr Phe Asp Leu
1 5

<210> 183
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 183
agggccaggc agcgtgttga cagcaggtac ttagcc 36

<210> 184
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 184
Arg Ala Arg Gln Arg Val Asp Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 185
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 185
ggtgcatcca gcagggccac t 21

<210> 186
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 186
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 187

<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 187
cagcagtatg gtagctcacc gctcact 27

<210> 188
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 188
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 189
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 189
cgctatgcca tgaac 15

<210> 190
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 190
Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 191
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 191
ggtattagtg ggagtggtgg taggacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 192
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 192

Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 193
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 193
gatcgcgatt tttggagtgg tccatttgac tac 33

<210> 194
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 194
Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 195
<211> 33

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 195
agggccagtc agagtgttag tagaaactta gcc 33

<210> 196
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 196
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 197
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 197
ggtgcatcca ccagggccac t 21

<210> 198
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 198
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 199
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 199
caccagtata gtaactggat gtgcagt 27

<210> 200
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 200
His Gln Tyr Ser Asn Trp Met Cys Ser

1 5

<210> 201
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 201
agttactact ggagc 15

<210> 202
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 202
Ser Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 203
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 203
cgtatttata tcagtgggag gaccaccttc aacccctccc tcaagagt 48

<210> 204
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 204
Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Thr Phe Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 205
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 205
gatagatatt atggctacct tgactac 27

<210> 206
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 206
Asp Arg Tyr Tyr Gly Tyr Leu Asp Tyr
1 5

<210> 207
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 207
agggccagtc agagtgttag ccgcagttac ttagcc 36

<210> 208
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 209
<211> 21

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 209
gatgcatcca gcagggccac t 21

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

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

<400> 210
Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 211
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 211
cagcagtatg gtagttcacc gagcacc 27

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

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

<400> 212
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Ser Thr
1 5

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

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

<400> 213
cattactact ggagc 15

<210> 214
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 214
His Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 215
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 215
tatatctatt acagtgggag caccaactac aacctctccc tcaagagt 48

<210> 216
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 216
Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Leu Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 217
<211> 18
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 217
ggtatgggct ttgactac 18

<210> 218
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 218
Gly Met Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 219
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 219
cgggcaagtc aggccattag aaatgattta ggc 33

<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 220
Arg Ala Ser Gln Ala Ile Arg Asn Asp Leu Gly
1 5 10

<210> 221
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 221
tctgcatcca gtttgcaaag t 21

<210> 222
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 222
Ser Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1 5

<210> 223
<211> 27

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 223
ctacagcata atagtttccc tccgacg 27

<210> 224
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 224
Leu Gln His Asn Ser Phe Pro Pro Thr
1 5

<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

Ala Pro Asp Tyr Met Lys Asn Val Leu Val Leu Thr Leu Ser
20 25 30

<210> 226
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 226
Phe Ala His Ala Phe Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro
1 5 10 15

Val Thr Leu Asp Asp Trp Gly Asp Val
20 25

<210> 227
<211> 3222
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 227
atgaagacgt tgctgttgga cttggctttg tggtcactgc tcttccagcc cgggtggctg 60

tcctttagtt cccaggtgag tcagaactgc cacaatggca gctatgaaat cagcgtcctg 120

atgatgggca actcagcctt tgcagagccc ctgaaaaact tggaagatgc ggtgaatgag 180

gggctggaaa tagtgagagg acgtctgcaa aatgctggcc taaatgtgac tgtgaacgct 240

actttcatgt attcggatgg tctgattcat aactcaggcg 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 tttggaaaac 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 gctgaagggt 780

gaccgagcag tggctgaaga cattgtcatt attctagtgg atcttttcaa tgaccagtac 840

tttgaggaca atgtcacagc ccctgactat atgaaaaatg tccttgttct gacgctgtct 900

cctgggaatt cccttctaaa tagctctttc tccaggaatc tatcaccaac aaaacgagac 960

tttgctcttg cctatttgaa tggaatcctg ctctttggac atatgctgaa gatatttctt 1020

gaaaatggag aaaatattac cacccccaaa tttgctcatg ctttcaggaa tctcactttt 1080

gaagggtatg acggtccagt gaccttggat gactgggggg atgttgacag taccatggtg 1140

cttctgtata cctctgtgga caccaagaaa tacaaggttc ttttgaccta tgatacccac 1200

gtaaataaga cctatcctgt ggatatgagc cccacattca cttggaagaa ctctaaactt 1260

cctaatgata ttacaggccg gggccctcag atcctgatga ttgcagtctt caccctcact 1320

ggagctgtgg tgctgctcct gctcgtcgct ctcctgatgc 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 atttcactga aaaacagaag atagaattga acaagttgct tcagattgac 1620

tattacaacc tgaccaagtt ctacggcaca gtgaaacttg ataccatgat cttcggggtg 1680

atagaatact gtgagagagg atccctccgg gaagttttaa atgacacaat ttcctaccct 1740

gatggcacat tcatggattg ggagtttaag atctctgtct tgtatgacat tgctaaggga 1800

atgtcatatc tgcactccag taagacagaa gtccatggtc gtctgaaatc taccaactgc 1860

gtagtggaca gtagaatggt 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

atgaaaccct tccgcccaga tttattcttg gaaacagcag aggaaaaaga gctagaagtg 2160

tacctacttg taaaaaactg ttgggaggaa gatccagaaa agagaccaga tttcaaaaaa 2220

attgagacta cacttgccaa gatatttgga ctttttcatg accaaaaaaa tgaaagctat 2280

atggatacct tgatccgacg tctacagcta tattctcgaa acctggaaca tctggtagag 2340

gaaaggacac agctgtacaa ggcagagagg gacagggctg acagacttaa ctttatgttg 2400

cttccaaggc tagtggtaaa gtctctgaag gagaaaggct ttgtggagcc ggaactatat 2460

gaggaagtta caatctactt cagtgacatt gtaggtttca ctactatctg caaatacagc 2520

acccccatgg aagtggtgga catgcttaat gacatctata agagttttga ccacattgtt 2580

gatcatcatg atgtctacaa ggtggaaacc atcggtgatg cgtacatggt ggctagtggt 2640

ttgcctaaga gaaatggcaa tcggcatgca atagacattg ccaagatggc cttggaaatc 2700

ctcagcttca tggggacctt tgagctggag catcttcctg gcctcccaat atggattcgc 2760

attggagttc actctggtcc ctgtgctgct ggagttgtgg gaatcaagat gcctcgttat 2820

tgtctatttg gagatacggt caacacagcc tctaggatgg aatccactgg cctccctttg 2880

agaattcacg tgagtggctc caccatagcc atcctgaaga gaactgagtg ccagttcctt 2940

tatgaagtga gaggagaaac atacttaaag ggaagaggaa atgagactac ctactggctg 3000

actgggatga aggaccagaa attcaacctg ccaacccctc ctactgtgga gaatcaacag 3060

cgtttgcaag cagaattttc agacatgatt gccaactctt tacagaaaag acaggcagca 3120

gggataagaa gccaaaaacc cagacgggta gccagctata aaaaaggcac tctggaatac 3180

ttgcagctga ataccacaga caaggagagc acctattttt aa 3222

<210> 228
<211> 1073
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 228
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

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
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
545 550 555 560

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

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

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

<210> 229
<211> 420
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 229
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

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
420

<210> 230
<211> 1444
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 230
gaattcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac agctacaggt 60

gtccactccc aggtgcagct acagcagtgg ggcgcaggac tgttgaagcc ttcggagacc 120

ctgtccctca cctgcgctgt ctttggtggg tctttcagtg gttactactg gagctggatc 180

cgccagcccc cagggaaggg gctggagtgg attggggaaa tcaatcatcg tggaaacacc 240

aacgacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc accatatcag tagacacgtc caagaaccag 300

ttcgccctga agctgagttc tgtgaccgcc gcggacacgg ctgtttatta ctgtgcgaga 360

gaacgtggat acacctatgg taactttgac cactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 420

agctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttcccccctgg caccctcctc 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 cagtcttcct cttcccccca aaacccaagg acaccctcat gatctcccgg 840

acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 900

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 960

tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1020

ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagccccat cgagaaaacc 1080

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1140

gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc 1200

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1260

cccgtgctgg actccgacgg ctccttcttc 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

```
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

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

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

<210> 232
<211> 722
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 232
gcggccgcct caccatggga tggagctgta tcatcctctt cttggtagca acagctacag 60

gtgtccactc cgaaatagtg atgacgcagt ctccagccac cctgtctgtg tctccagggg 120

aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtgttag cagaaactta gcctggtatc 180

agcagaaacc tggccaggct cccaggctcc tcatctatgg tgcatccacc agggccactg 240

gaatcccagc caggttcagt ggcagtgggt ctgggacaga gttcactctc accatcggca 300

gcctgcagtc tgaagatttt gcagtttatt actgtcagca gtataaaacc tggcctcgga 360

cgttcggcca agggaccaac gtggaaatca aacgtacggt ggctgcacca tctgtcttca 420

tcttcccgcc atctgatgag cagttgaaat ctggaactgc ctctgttgtg tgcctgctga 480

ataacttcta tcccagagag gccaaagtac agtggaaggt ggataacgcc ctccaatcgg 540

gtaactccca ggagagtgtc acagagcagg acagcaagga cagcacctac agcctcagca 600

gcaccctgac cctgagcaaa gcagactacg agaaacacaa agtctacgcc tgcgaagtca 660

cccatcaggg cctgagctcg cccgtcacaa agagcttcaa caggggagag tgttagtcta 720

ga 722

<210> 233
<211> 233
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 233

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val
20 25 30

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val
35 40 45

Ser Arg Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg
50 55 60

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

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Gly Ser
85 90 95

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

Trp Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Val Glu Ile Lys Arg Thr
115 120 125

Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu
130 135 140

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

Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
165 170 175

Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr

180 185 190

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

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

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 234
<211> 112
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 234
ataagaatgc ggccgcctca ccatgggatg gagctgtatc atcctcttct tggtagcaac 60

agctacaggt gtccactccg aaatagtgat gacgcagtct ccagccaccc tg 112

<210> 235
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Cebador sintético

<400> 235
gccaccgtac gtttgatttc cacgttggtc ccttggccga acgtc 45

<210> 236
<211> 103
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 236
ccggaattcc tcaccatggg atggagctgt atcatcctct tcttggtagc aacagctaca 60

ggtgtccact cccaggtgca gctacagcag tggggcgcag gac 103

<210> 237
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 237
ggaggctgag ctgacggtga ccagggttcc ctggccccag tggtc 45

<210> 238
<211> 352
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 238
caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattactact 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 gggccaggga accctggtca ccgtctcctc ag 352

<210> 239
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 240
<211> 322
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 240
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc 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

<210> 241
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 242
<211> 353
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 242
caggtgcagt tgcaggagtc gggcccagga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgc ctccatcagt cattactact 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 gggccaggga accctggtca ccgtctcctc agc 353

<210> 243
<211> 117
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 244
<211> 329
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 244
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

<210> 245
<211> 109
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 246
<211> 362
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 246
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc cgctatgcca tgaactgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcaggt attagtggta gtggtggtag cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcgc 300

gatttttgga gtggtccatt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca 360

gc 362

<210> 247
<211> 120
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 248
<211> 323
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 248

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgta gggccagtca gagtgttagt agaagcttag cctggtacca gcagaaacct 120

ggccaggctc ccaggctcct catctacggt gcatccacca gggccactgg gatcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 240

gaagatgttg cagtttatta ctgtcagcag tataataact ggatgtgcag ttttggccag 300

gggaccaagc tggagatcaa acg 323

<210> 249
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 249
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

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

<400> 250
cattactact ggagc 15

<210> 251
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 251
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 252
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 252
cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 253
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 253
Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 254
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 254
gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 255
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 255
Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 256
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 256
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

<210> 257
<211> 12
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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

<210> 258
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 258
ggtgcatcca gcagggccgc t 21

<210> 259
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 259
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Ala
1 5

<210> 260
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 260
cagcagtatg gtagctccct cact 24

<210> 261
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 261
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Leu Thr
1 5

<210> 262
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 262
cattactact ggagc 15

<210> 263
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 263
His Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 264
<211> 48
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 264
cgtatctata tcagtgggag gaccagctac aacccctccc tcaagagt 48

<210> 265
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 265

Arg Ile Tyr Ile Ser Gly Arg Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 266

<211> 27

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 266

gatcggctaa ctgggtactt tgactac 27

<210> 267

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Péptido sintético

<400> 267

Asp Arg Leu Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 268

<211> 36

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 268
agggccagtc agagtgttag cagcagctac ttagcc 36

<210> 269
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 269
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 270
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 270
ggtacatcca gcagggccac t 21

<210> 271
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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

<400> 271
Gly Thr Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 272
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 272
cagcagtatg gtagctcacc catgtgcagt 30

<210> 273
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 273
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Met Cys Ser
1 5 10

<210> 274
<211> 15
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 274
cgctatgcca tgaac 15

<210> 275
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 275
Arg Tyr Ala Met Asn
1 5

<210> 276
<211> 51
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 276
ggtattagtg gtagtggtgg tagcacatac tacgcagact ccgtgaaggg c 51

<210> 277
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

Gly

<210> 278
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 278
gatcgcgatt tttggagtgg tccatttgac tac 33

<210> 279
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 279
Asp Arg Asp Phe Trp Ser Gly Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 280
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 280
agggccagtc agagtgttag tagaagctta gcc 33

<210> 281
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 281
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser Leu Ala
1 5 10

<210> 282

<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 282
ggtgcatcca ccagggccac t 21

<210> 283
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 283
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 284
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 284
cagcagtata ataactggat gtgcagt 27

<210> 285
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 285
Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Met Cys Ser
1 5

<210> 286
<211> 357
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 286
caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcgctg tctttggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120

ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atcaatcatc gtggaaacac caacgacaac 180

ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttcgccctg 240

aagctgagtt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtttatt actgtgcgag agaacgtgga 300

tacacctatg gtaactttga ccactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 287

<211> 119

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<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

<210> 288
<211> 315
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 288
gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc 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

<210> 289
<211> 105
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 290

<211> 15

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

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

<400> 290
ggttactact ggagc 15

<210> 291
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 291
Gly Tyr Tyr Trp Ser
1 5

<210> 292
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 292
gaaatcaatc atcgtggaaa caccaacgac aacccgtccc tcaag 45

<210> 293
<211> 16

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 294
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 294
gaacgtggat acacctatgg taactttgac cac 33

<210> 295
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

<210> 296
<211> 37
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 296
agggccagtc agagtgttag cagcaggtac ttagcct 37

<210> 297
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 297
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 298
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 298

ggtgcatcca gcagggccac tg 22

<210> 299
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 299
Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 300
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 300
cagcagtatg aaaggtcatt cactt 25

<210> 301
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 301
Gln Gln Tyr Glu Arg Ser Phe Thr
1 5

<210> 302
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(3)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Met or Trp

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Ser or Asn

<400> 302
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 303
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido o no está presente

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (9)..(9)
<223> Thr or Ile

<220>

<221> MOD_RES
<222> (10)..(10)
<223> Tyr, Thr, or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (11)..(12)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (13)..(13)
<223> Leu or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (15)..(15)
<223> Ser or Gly

<400> 303
Xaa Ile Xaa Xaa Ser Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa
1 5 10 15

<210> 304
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES

<222> (1)..(6)
<223> Cualquier aminoácido y esta región pueden abarcar 4 to 6 residues

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(10)
<223> Cualquier aminoácido y esta región pueden abarcar 2 to 3 residues

<400> 304
Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa Xaa Xaa Asp Tyr
1 5 10

<210> 305
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Arg or Lys

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)

<223> Val or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(16)
<223> Cualquier aminoácido y esta región pueden abarcar entre 5 y 9 residuos

<400> 305
Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 306
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(2)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(7)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 306
Xaa Xaa Ser Xaa Arg Xaa Xaa
1 5

<210> 307
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Secuencia consenso sintética

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Gln, His, or Met

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Tyr or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(10)
<223> Cualquier aminoácido y esta región pueden abarcar entre 5 y 7 residuos

<400> 307
Xaa Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 308
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 308
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactccgaa 60

atagtgatga cgcagtctcc agccaccctg tctgtgtctc caggggaaag agccaccctc 120

tcctgcaggg ccagtcagag tgttagcaga aacttagcct ggtatcagca gaaacctggc 180

caggctccca ggctcctcat ctatggtgca tccaccaggg ccactggaat cccagccagg 240

ttcagtggca gtgggtctgg gacagagttc actctcacca tcggcagcct gcagtctgaa 300

gattttgcag tttattactg tcagcagtat aaaacctggc ctcggacgtt cggccaaggg 360

accaacgtgg aaatcaaacg tacggtggct gcaccatctg tcttcatctt cccgccatct 420

gatgagcagt tgaaatctgg 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

<210> 309
<211> 1407
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 309
atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag 60

gtgcagctac agcagtgggg cgcaggactg ttgaagcctt cggagaccct gtccctcacc 120

tgcgctgtct ttggtgggtc tttcagtggt tactactgga gctggatccg ccagccccca 180

gggaaggggc tggagtggat tggggaaatc aatcatcgtg gaaacaccaa cgacaacccg 240

tccctcaaga gtcgagtcac catatcagta gacacgtcca agaaccagtt cgccctgaag 300

ctgagttctg tgaccgccgc ggacacggct gtttattact gtgcgagaga acgtggatac 360

acctatggta actttgacca ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtcag ctcagcctcc 420

accaagggcc catcggtctt ccccctggca ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca 480

gcggccctgg gctgcctggt caaggactac ttccccgaac cggtgacggt gtcgtggaac 540

tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggctg tcctacagtc ctcaggactc 600

tactccctca gcagcgtggt gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc 660

tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agaaagttga gcccaaatct 720

tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca 780

gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccggac ccctgaggtc 840

acatgcgtgg tggtggacgt gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg 900

gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg 960

taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac 1020

aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc 1080

aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccggga tgagctgacc 1140

aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg 1200

gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac 1260

tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag 1320

gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag 1380

agcctctccc tgtctccggg taaataa 1407

<210> 310
<211> 1410
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 310

atggagtttg ggctgagctg gctttttctt gtggctattt taaaaggtgt ccagtgtgag 60

gtgcagctgt tggagtctgg gggaggcttg gtacagcctg gggggtccct gagactctcc 120

tgtgcagcct ctggattcac ctttagccgc tatgccatga actgggtccg ccaggctcca 180

gggaaggggc tggagtgggt ctcaggtatt agtgggagtg gtggtaggac atactacgca 240

gactccgtga agggccggtt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac actatatctg 300

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gccgtatatt actgtgcgaa agatcgcgat 360

ttttggagtg gtccatttga ctactggggc cagggaaccc tggtcaccgt cagctcagcc 420

tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtcctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660

atctgcaacg tgaatcacaa gcccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720

tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct gggggggaccg 780

tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gacccctgag 840

gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900

gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960

acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020

tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080

gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140

accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200

gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260

gactccgacg gctccttctt cctctacagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320

caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380

aagagcctct ccctgtctcc gggtaaataa 1410

<210> 311
<211> 705
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

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

<400> 311
atgaggctcc ctgctcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60

gaaatagtga tgacgccgtc ttcagccacc ctgtctgtgt ctccagggga gagagccacc 120

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagt agaaacttag cctggtacca gcagaaacct 180

ggccaggctc ccaggctcct catctatggt gcatccacca gggccactgg tatcccagcc 240

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag cctgcagtct 300

gaagattttg cagtttatta ctgtcaccag tatagtaact ggatgtgcag ttttggccag 360

gggaccaagc tggagatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 420

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480

cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540

gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacc 600

ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 312
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Leu or Val

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Ser or Gly

<400> 312
Ser Xaa Lys Xaa

1

<210> 313
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> Lys or Arg

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Ala or Ser

<220>
<221> MOD_RES
<222> (6)..(6)
<223> Val or Leu

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(7)
<223> Ser or Leu

<400> 313
Xaa Xaa Ser Gln Ser Xaa Xaa
1 5

<210> 314
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 314
Leu Glu Asp Asn Val Thr Ala Pro Asp Tyr
1 5 10

<210> 315
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 315
Arg Asn Leu Thr Phe Glu Gly Tyr Asp Gly Pro Val Thr Leu Asp
1 5 10 15

<210> 316
<211> 18
<212> PRT
<213> Escherichia coli

<400> 316
Asn Thr Phe Tyr Cys Cys Glu Leu Cys Cys Asn Pro Ala Cys Ala Gly

1 5 10 15

Cys Tyr

<210> 317
<211> 638
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<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

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
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
```

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 Lys
625 630 635

<210> 318
<211> 707
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

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

<400> 318

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
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

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

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

<400> 319
Gly Phe Leu Gly
1

~~504~~
496
~~498~~

MOLÉCULAS DE ANTICUERPO ANTI-GCC Y COMPOSICIONES Y MÉTODOS RELACIONADOS

RESUMEN

Anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de anticuerpos que se unen a GCC. Los anticuerpos se unen a un dominio extracelular de GCC y pueden ser internalizadas. En algunas formas de realización, los anticuerpos son humanizados, quiméricos o humanos. También se divulgan ácidos nucleicos y vectores que codifican los anticuerpos, o porciones de los mismos, células recombinantes que contienen a los ácidos nucleicos y composiciones que comprenden a los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno. La invención también provee métodos terapéuticos y de diagnóstico que emplean los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno provistos en la presente.

505
497
~~497~~

REIVINDICACIONES

1. un método de producción de un inmunoconjugado, el método comprende proporcionar una molécula anticuerpo anti-GCC que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada, en donde la región variable de cadena ligera comprende tres regiones de cadena ligera determinantes de la complementariedad (LCDR1, LCDR2, y LCDR3), y la región variable de la cadena pesada comprende tres regiones de cadena pesada determinantes de la complementariedad (HCDR1, HCDR2, y HCDR3),
en donde la región variable de la cadena ligera comprende: un LCDR1 que comprende la secuencia amino ácido de SEQ ID NO:112, un LCDR2 que comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:114 y un LCDR3 que comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:116; y
en donde la región variable de la cadena pesada comprende: un HCDR1 que comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:106, un HCDR2 que comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:108 y un HCDR3 que comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:110, y
poner en contacto la molécula anticuerpo anti-GCC con un radical no anticuerpo que comprende un agente terapéutico o marcador bajo condiciones que permitan la producción de un inmunoconjugado, produciendo de esta manera el inmunoconjugado.

2. El método de la reivindicación 1, que además comprende unir el agente terapéutico o marcador con un radical de enlace.

3. El método de la reivindicación 2, en donde la unión del agente terapéutico o marcador con el radical de enlace es llevada a cabo antes del contacto de la molécula anticuerpo anti-GCC con el radical no anticuerpo que comprende el agente terapéutico o marcador.

4. El método de la reivindicación 2 o 3, en donde el radical de enlace comprende maleimidocaproilo (mc) o maleimidocaproilo –L –valina –L –citrullina - p-aminobenzilocarbamato (mc-vc).

5. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende contactar la molécula anticuerpo anti-GCC con una solución que comprende borato de sodio y DTPA.

~~506~~
498
~~500~~

6. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende contactar la molécula anticuerpo anti-GCC con un agente reductor.

7. El método de la reivindicación 6, en donde el agente reductor comprende *tris*(2-carboxietilo) fosfina (TCEP).

8. El método de la reivindicación 7, en donde aproximadamente 2.28 hasta aproximadamente 2.6 equivalentes en moles de TCEP es contactado con una mol de molécula anticuerpo anti-GCC.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde aproximadamente 4.4 hasta aproximadamente, 4.9 equivalentes en moles de radical no anticuerpo está en contacto con una mol de molécula anticuerpo anti–GCC.

10. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el paso de contacto es llevado a cabo en la presencia de DMSO.

11. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende contactar la molécula de anticuerpo anti - GCC con N-acetil cisteina.

12. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que además comprende el aislamiento del inmunoconjugado.

13. El método de la reivindicación 12, en donde el paso del aislamiento comprende la filtración tangencial de flujo.

14. El método de la reivindicación 12 o 13, en donde el paso del aislamiento comprende ultrafiltración o diafiltración.

15. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el radical no anticuerpo está conjugado con una o más cisteinas de la molécula anticuerpo.

16. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el terapéutico o el marcador comprende una auristatina.

~~502~~
499

17. El método de la reivindicación 16, en donde el terapéutico o el marcador comprende MMAE o MMAF. 501

18. El método de la reivindicación 1, en donde el paso de contacto es llevado a cabo en la presencia de un agente de cruzamiento heterobifuncional.

19. El método de la reivindicación 18, en donde el agente de cruzamiento heterobifuncional comprende succinimidilo- 4- (N-maleimidometilo) ciclohexano- 1-carboxilato.

20. El método de la reivindicación 19, en donde el agente de cruzamiento heterobifuncional comprende SPDB.

21. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que además comprende el aislamiento del inmunoconjugado.

22. El método de la reivindicación 21, en donde el paso del aislamiento comprende cromatografía de filtración en gel.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la cromatografía de filtración en gel comprende el uso de una columna SEPHADEX™ G-25.

24. El método de cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en donde el agente terapéutico o el marcador comprende una maitasina.

25. El método de la reivindicación 24 en donde el terapéutico o marcador comprende DM1 o DM4.

26. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la molécula anticuerpo anti-GCC además comprende marcos de cadena pesada y cadena ligera de la región variable.

27. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde dicha molécula anticuerpo anti-GCC es un anticuerpo IgG1.

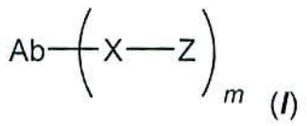
28. El método de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia amino ácido de SEQ

~~499~~
500

ID NO:20 y la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO:18.

502

29. El método de la reivindicación 1, en donde el inmunoconjugado tiene una estructura de fórmula (I):



(*I*)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde:
Ab es la molécula anticuerpo anti-GCC
X es un radical conector el cual conecta Ab y Z;
Z es un agente terapéutico o un marcador; y
m es el número de radicales –X-Z por molécula anticuerpo anti-GCC en el inmunoconjugado que tienen la estructura de fórmula (I), y *m* es un entero desde 1 hasta 15.

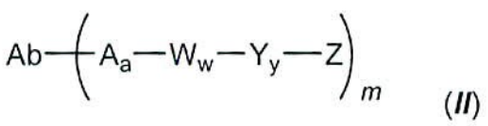
30. El método de la reivindicación 29, en donde Z es un marcador detectable.

31. El método de la reivindicación 29, en donde –Z es una maitansina o una auristatina.

32. El método de la reivindicación 29, en donde –Z es DM1 o DM4.

33. El método de la reivindicación 29, en donde –Z es MMAE o MMAF.

34. El método de la reivindicación 29, en donde el conector –X- tiene la fórmula $-A_a-W_w-Y_y-$, y el inmunoconjugado tiene la estructura de la fórmula (*II*):



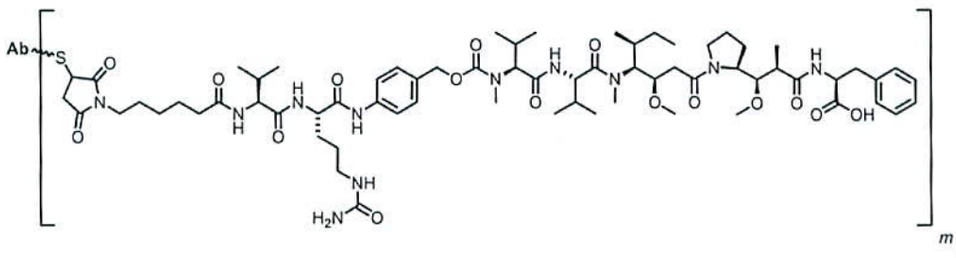
(*II*)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde:
-A- es una unidad de camilla:
A es 0 o 1;
cada –W- de manera independiente es una unidad Amino Ácido;
w es un entero en el rango desde 0 hasta 12;
- Y - es un agente terapéutico o un marcador; y
m es un entero desde 1 hasta 15.

~~509~~
501

35. El método de la reivindicación 29, en donde el inmunoconjugado tiene la estructura de fórmula (*I-4*):

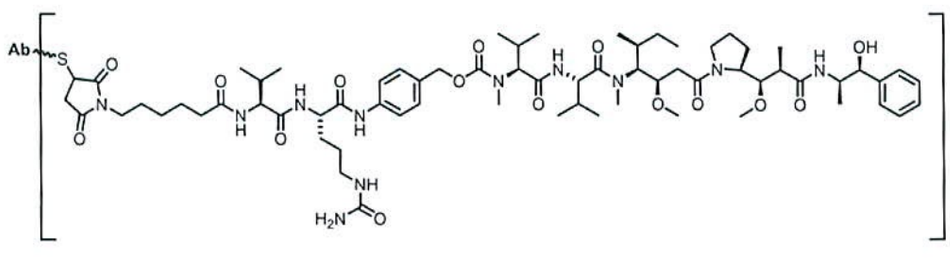
503



(***I-4***)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde *m* es un entero desde 1 hasta 8.

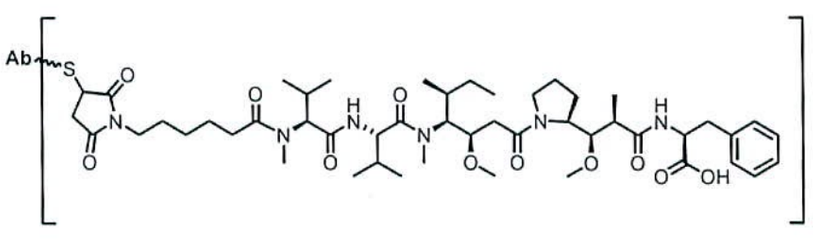
36. El método de la reivindicación 29, en donde el inmunoconjugado tiene la estructura de la fórmula (*I-5*):



(***I-5***)

una sal farmacéutica mente aceptable de la misma, en donde *m* es un entero desde 1 hasta 8.

37. El método de la reivindicación 29, en donde el inmunoconjugado tiene la estructura de la fórmula (*I-7*):



(***I-7***)

o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en donde *m* es un entero desde 1 hasta 8.

38. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde *m* es desde 1 hasta 3.

39. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde *m* es desde 3 hasta 5.

40. El método de cualquiera de las reivindicaciones 35 a 37, en donde *m* es el entero 4.

41. Un inmunoconjugado producido por el método de cualquiera de las 504 reivindicaciones 1 a 40.

42. Una composición farmacéutica que comprende el inmunoconjugado de la reivindicación 41 y un portador farmacéuticamente aceptable.

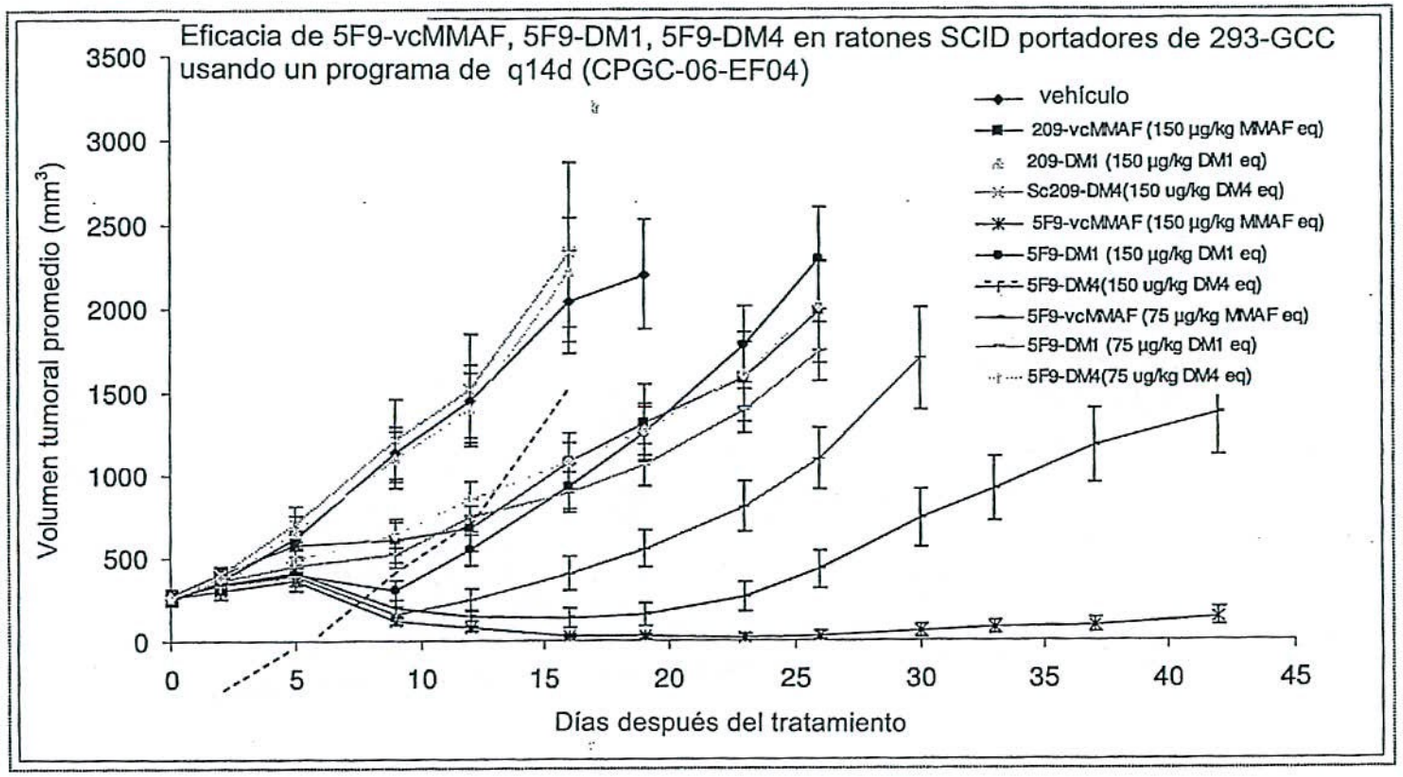

Eficacia de 5F9-vcMMAF, 5F9-DM1, 5F9-DM4 en ratones SCID portadores de 293-GCC usando un programa de q14d (CPGC-06-EF04)
Volumen tumoral promedio (mm3)
Días después del tratamiento
vehículo
209-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq)
209-DM1 (150 µg/kg DM1 eq)
Sc209-DM4(150 ug/kg DM4 eq)
5F9-vcMMAF (150 µg/kg MMAF eq)
5F9-DM1 (150 µg/kg DM1 eq)
5F9-DM4(150 ug/kg DM4 eq)
5F9-vcMMAF (75 µg/kg MMAF eq)
5F9-DM1 (75 µg/kg DM1 eq)
5F9-DM4(75 ug/kg DM4 eq)

Figura 1

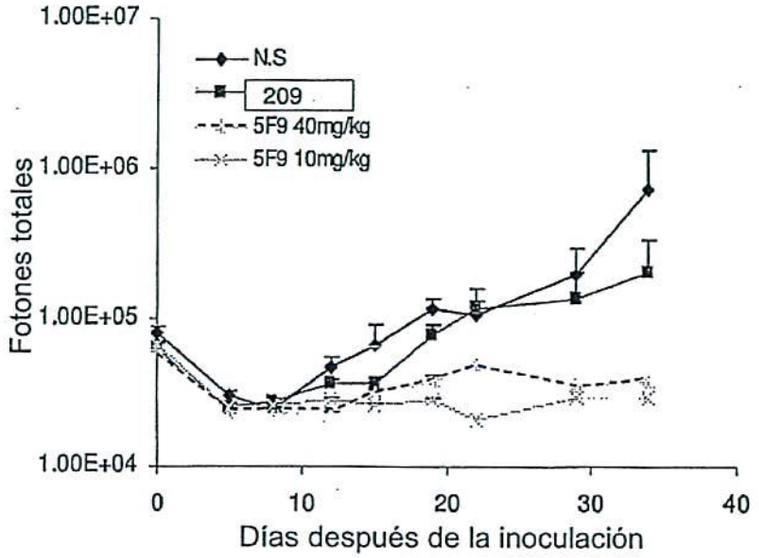
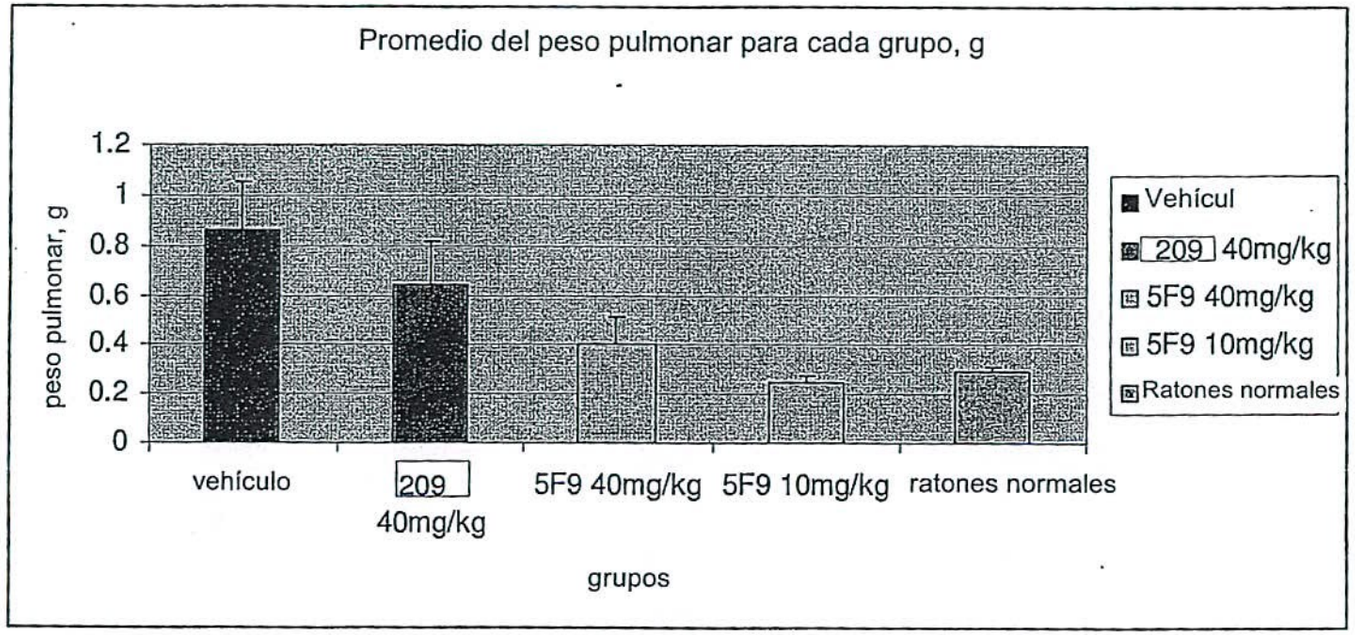

1.00E+07
1.00E+06
1.00E+05
1.00E+04
Fotones totales
N.S
209
5F9 40mg/kg
5F9 10mg/kg
0
10
20
30
40
Días después de la inoculación

Figura 2



Prueba T: vehículo **v.s 209 40mg/kg P=0.4**

Vehículo **v.s 5F9 40mg/kg P<0.05**

Vehículo **v.s 5F9 10mg/kg P <0.01**

Figura 3

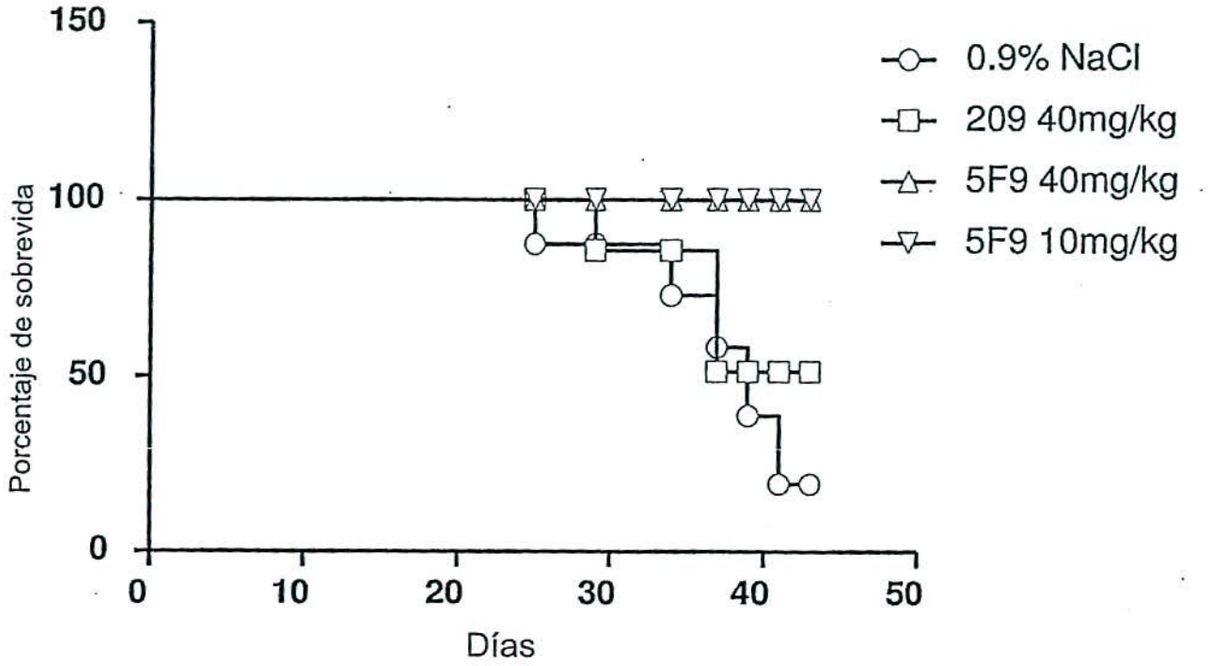

150
100
50
0
Porcentaje de sobrevida
0
10
20
30
40
50
Días
0.9% NaCl
209 40mg/kg
5F9 40mg/kg
5F9 10mg/kg

Figura 4