

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 381 841**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04713982 .9**
96 Fecha de presentación: **24.02.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1648506**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **26.04.2006**

54 Título: **Método para tratar el sarcoma sinovial**

30 Prioridad:
11.07.2003 US 486195 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2012

73 Titular/es:
ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
2-1, SAKADO 3-CHOME, TAKATSU-KU
KAWASAKI-SHI
KANAGAWA 213-0012, JP

72 Inventor/es:
NAKAMURA, Yusuke;
KATAGIRI, Toyomasa y
KUHARA, Motoki

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 381 841 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método para tratar el sarcoma sinovial

2. Antecedentes de la invención**2.1. Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones para tratar y/o prevenir el sarcoma sinovial. Además, la presente invención se refiere a métodos, composiciones y kits para diagnosticar el sarcoma sinovial. Adicionalmente, la presente invención se refiere a anticuerpos y a su uso en el tratamiento del sarcoma sinovial.

2.2. Descripción de la técnica relacionada

Recientemente, la terapia con dianas moleculares que usa anticuerpos monoclonales, tales como trastuzumab (Herceptin) contra ErbB2 (Fendly, B. M. et al., *Cáncer RES* 50:1550-8., 1990) y rituximab (Rituxan) contra CD20 (Maloney, D. G. et al., *Blood*. 90: 2188 95., 1997) ha contribuido, en algunos casos, a mejorar los resultados del tratamiento del cáncer de mama y linfoma maligno. Estas terapias prometedoras son los primeros ejemplos de fármacos contra el cáncer, basados en investigación genómica, que se unen directamente a proteínas diana en la superficie de las células tumorales. Se cree que los anticuerpos humanizados ejercen un efecto antitumoral a través de la inhibición de la transducción de señales de crecimiento mediante el bloqueo de receptores de la superficie celular y regulación negativa de moléculas diana por interacción con anticuerpos específicos y/o citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA). Aunque los mecanismos exactos del efecto antitumoral basado en anticuerpos continúan sin aclararse, estas terapias son alternativas prometedoras, especialmente en el tratamiento de cánceres quimio-resistentes o radio-resistentes.

Entre los sarcomas definidos como tumores malignos, que se producen en los tejidos mesenquimáticos, los osteosarcomas, el sarcoma de Ewing y los rhabdomyosarcomas son generalmente sensibles a la quimioterapia. Sin embargo, muchos otros sarcomas, especialmente los sarcomas de células fusiformes en adultos, son enfermedades difíciles de tratar debido a la quimio - y radio- resistencia (Crist, W. M. et al., *J. Clin Oncol* 19: 3091-102., 2001; Wunder, J. S. et al., *J Bone Joint Surg Am*. 80:1020-33., 1998; Ferguson, W. S. y Goorln, A. M., *Cancer Invest* 19: 315 292., 2001; Adjuvant chemotherapy for localised resectable soft-tissue sarcoma of adult: meta-analysis of individual data. *Sarcoma Meta-analysis Collaboration, Lancet*. 350: 1647-54., 1997). El sarcoma sinovial (SS) es un prototipo de estos tumores, y para una mejora adicional de resultados deberían desarrollarse nuevas modalidades de tratamiento incluyendo la terapia basada en anticuerpos, aunque el pronóstico del SS ha mejorado con avances en el tratamiento multi- disciplinario.

Para el desarrollo de una terapia basada en anticuerpos contra tumores diana, un clave crítica es la identificación de una molécula de superficie celular que se sobreexpresa en la mayoría de los tumores diana y cuya expresión esté ausente o sea mínima en los tejidos de órganos normales. Sin embargo, es difícil identificar proteínas expresadas específicamente en tumores, y no ha habido ninguna descripción de tales proteínas expresadas específicamente en sarcoma sinovial ni en otros tumores contra los que se desea establecer terapias basadas en anticuerpos.

El documento WO 02/055705 se refiere a secuencias de ácido nucleico y polipéptidos de la familia de receptores frizzled y a métodos de uso de las mismas para el tratamiento y prevención de enfermedades.

El documento WO 02/092635 se refiere a composiciones y a métodos para identificar, tratar y prevenir el cáncer dirigiendo los dominios extracelulares de la familia de proteínas de receptores frizzled.

Koike, J et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 262:39-43,1999 se refieren a la clonación molecular de frizzled-10.

El documento WO 96/02641 se refiere a materiales y a métodos relacionados con el diagnóstico y con el tratamiento profiláctico y terapéutico del sarcoma sinovial.

3. Sumario de la invención

Considerando los problemas anteriores y las exigencias sobre el desarrollo de agentes terapéuticos para el sarcoma sinovial, el grupo de inventores de la presente invención describió previamente que el SS podría originarse a partir de las células de la cresta neural y observó que las características biológicas del SS eran similares a las del tumor maligno de la vaina nerviosa periférica mediante análisis pangenómico de modelos de expresión de genes usando una micromatriz de ADNc que consistía en 23,040 genes (Nagayama, S. et al., *Cáncer Res*. 62:5859-66., 2002). Como resultado, los actuales inventores identificaron 26 genes que normalmente se regulaban de manera positiva en el SS, cuyos productos deberían ser dianas moleculares adecuadas para el desarrollo de nuevos fármacos terapéuticos. Entre estos genes regulados positivamente, basándose en los siguientes criterios, se seleccionó un gen candidato adecuado para el desarrollo de terapia diana molecular para el SS: (i) la expresión en los órganos vitales, incluyendo cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón y médula ósea, fue relativamente baja para evitar efectos secundarios críticamente adversos; y (ii) se había pronosticado que el producto génico era la proteína de membrana

integral plasmática. Basándose en estos criterios, los autores de la invención se centraron sobre uno de los receptores de la superficie celular para la Wnts, Frizzled homólogo 10 (FZD10), que pertenece a la familia de proteínas Frizzled de siete dominios transmembrana. Aunque se había demostrado que la expresión de FZD10 se regulaba positivamente en cáncer colorrectal primario (Terasaki, H. et al., *Int J Mol Med.* 9: 107-12., 2002) y en cáncer gástrico primario (Kirikoshi, H. et al., *Int J Oncol.* 19: 767-71., 2001) así como en SS, los efectos biológicos exactos de FZD10 en tumorigénesis siguen sin aclararse. Por tanto, la posible función de FZD10 en el crecimiento tumoral podría posiblemente aclararse mediante inhibición de la transducción de señal de FZD10.

En este momento, para el desarrollo de terapia basada en anticuerpos para el sarcoma sinovial (SS), los presentes inventores generaron un anticuerpo policlonal específico (pAb TT641) y anticuerpos monoclonales (mAb) que reconocían el dominio extracelular N-terminal de la proteína FZD10 (DEC-FZD10). Al igual que los criterios para la selección de dianas moleculares mencionados anteriormente, los presentes inventores revelaron, con análisis inmunohistoquímico usando el pAb TT641, que la expresión de FZD10 no existía o era baja en órganos vitales normales salvo en el epitelio en algunos tejidos de órganos. Además, los presentes inventores demostraron que este anticuerpo específico era eficaz mediando la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) contra células de SS que sobreexpresan la proteína FZD10. Además, experimentos realizados *in vivo* usando ratones atímicos demostraron con éxito que la inyección intratumoral de pAb TT641 atenuaba el crecimiento de xenoinjertos de SS presumiblemente a través de la inducción de la apoptosis de células tumorales.

En base a los descubrimientos anteriores, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que el anticuerpo para FZD10 poseía potencial terapéutico en el tratamiento y diagnóstico de SS y de otros tumores que sobreexpresan FZD10.

La presente invención proporciona:

1. Un anticuerpo contra la proteína Frizzled homólogo 10 (FZD10) o un fragmento de la misma para su uso en un método para el tratamiento o prevención de sarcoma sinovial.

2. Un método *in vitro* para el diagnóstico o pronóstico de sarcoma sinovial, o de una predisposición a desarrollar sarcoma sinovial en un sujeto, que comprende:

- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo contra la proteína FZD10 o un fragmento del mismo;
- (b) detectar la proteína FZD10 en la muestra; y
- (c) evaluar si el sujeto padece o no, o corre el riesgo de desarrollar, sarcoma sinovial basándose en la abundancia relativa de la proteína FZD10 en comparación con un control.

3. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o prevención de sarcoma sinovial, que comprende un anticuerpo o un fragmento que se dirige contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225, o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce otros miembros de la familia de proteínas FZD.

4. Un kit para el diagnóstico o pronóstico de sarcoma sinovial, que comprende un anticuerpo o un fragmento que se suscita contra un péptido que comprende el menos los restos 43-56, 61-72, 156-159, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225, o 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce otros miembros de la familia de proteínas FZD.

5. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo contra la proteína Frizzled homólogo 10 (FZD10), que se suscita contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225, o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce a otros miembros de la familia de proteínas FZD. La presente invención también proporciona.

6. El anticuerpo de 1 o el método de 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal.

7. El anticuerpo de 1, en el que el anticuerpo se dirige contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225, o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1

8. El método de 2, en el que el anticuerpo se dirige contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225, o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1

9. El anticuerpo o un fragmento del mismo de 5, que se dirige contra un péptido que consiste en los 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1

10. El anticuerpo o un fragmento del mismo de 5 o 9, que es un anticuerpo policlonal o monoclonal.

5

4. Breve descripción de las figuras

La Figura 1A es una fotografía que muestra un análisis de transferencia de Northern de FZD10 en tejidos humanos adultos normales (corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñones, páncreas, médula ósea y placenta), líneas celulares SS (HS-SY-2 y YaFuSS) y especímenes quirúrgicos de SS (SS487 y SS582).

10

La Figura 1B es una fotografía que muestra un análisis de transferencia de Northern de FZD10 en líneas celulares de cáncer de colon (LoVo, HT29 y SW480) y líneas celulares de SS (SYO-1, HS-SY-2 y YaFuSS).

La Fig. 2A y 2B son fotografías que muestran la especificidad del anticuerpo DEC-FZD10 purificado por afinidad (pAb TT641) que reconoce el dominio extracelular N-terminal de FZD10 (DEC-FZD10).

15

La Fig. 2A son fotografías que muestran análisis de transferencia de Western de FZD10 en diversas líneas celulares tumorales: líneas celulares SS (HS-SY-2 y YaFuSS), líneas celulares de cáncer de colon (SW480, LoVo, DLD1, HT29, HCT116, SNU-C4 y SNU-C5), la línea celular de adenocarcinoma cervical (HeLa) y la línea celular de fibrosarcoma (HT1080). La expresión de β -actina se usó como control de carga

20

La Fig. 2B son fotografías que muestran análisis semi-cuantitativo por PCR en TR de la familia de genes FZD en las mismas líneas celulares tumorales examinadas en la Fig. 2A. La expresión del gen β 2-microglobulina (β 2MG) sirvió como control interno. Los miembros de la familia FZD se colocaron en orden de la homología de secuencias de aminoácidos para el DEC-FZD10; FZD9 fue el más homólogo al DEC-FZD10.

Las Figs. 3A, 3B y 3C son fotografías que muestran la localización subcelular de la proteína FZD10 con análisis inmunocitoquímico.

25

La Fig. 3A es una fotografía que muestra el análisis de transferencia de western que indica el establecimiento de células COS7-FZD10, que sobreexpresan de manera estable FZD10. S5, S9, S10, S3 y S11 eran representantes de células transfectantes estables de COS7-FZD10 y los productos expresados de manera exógena tenían el mismo tamaño que el del FZD10 endógeno expresado en las líneas celulares SS, HS-SY-2 y YaFuSS.

30

La Fig. 3 B es una fotografía que muestra una tinción inmunocitoquímica usando el anticuerpo anti-myc y el pAb TT641. El panel izquierdo muestra una célula inmunotefñida con anti-myc conjugado con Rojo Texas. El panel central muestra la misma célula tratada con pAb TT641 (Alexa Flour 488), y ambas señales se solaparon en la imagen bi-color como una señal amarilla (panel derecho).

La Fig. 3C son fotografías que muestran una tinción inmunocitoquímica con pAb TT641 para la detección de FZD10 endógeno en líneas celulares de SS (HS-SY-2 y YaFuSS).

35

La Fig. 4 son gráficos que muestran un análisis de citometría de flujo usando pAb TT641 en diversas líneas celulares tumorales. Las líneas continuas muestran el nivel de expresión de FZD10, un antígeno de superficie celular, detectado con pAb TT641, mientras que las líneas discontinuas representan la señal fluorescente de células incubadas con IgG de conejo no-inmunizado como control negativo.

40

La Fig. 5 es una fotografía que muestra un mapeo epitópico de pAb con péptidos lineales de solapamiento sintéticos. La membrana que contenía varios péptidos de 10 restos diferentes en un aminoácido y que incluían el aminoácido completo del DEC-FZ10 se exploró con pAb TT641 y la unión se detectó con anti-IgG de conejo de cabra conjugado con HRP. Las letras en negrita indican los posibles epítomos núcleo del DEC-FZ10.

Las Figs. 6A a 6O son fotografías que muestran análisis inmunohistoquímico usando el pAb TT641 en tejidos humanos adultos normales, tejidos tumorales de SS, cáncer de colon primario y lesiones hepáticas metastásicas del cáncer de colon. En estas figuras, A = placenta, B = cerebro, C = corazón, D = pulmón, E = hígado, F y G = riñones de individuos diferentes, H e I = estómago del mismo individuo, J = colon, K y L = células tumorales de SS del mismo espécimen SS bifásico y M, N, y O = cáncer de colon primario y su lesión hepática metastásica del mismo paciente. El aumento original de A, B, C, D, E, F, G, I, J, K y M = x100; H y N = x40; L y O = x200.

50

La Fig. 7A es un gráfico que muestra la CCDA mediada por pAb TT641 contra células que sobreexpresan FZD10. La citotoxicidad se evaluó por medición cuantitativa de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada tras la lisis celular, cuando células diana y efectoras se incuban conjuntamente con 7 μ g/ml de pAb TT641 a una proporción de E:D de 25:1. En esta figura, D = células diana (SYO-1), E = células efectoras (CMSP), D espont = liberación espontánea de LDH de células diana, E espont = liberación espontánea de LDH de células efectoras, y Ab = pAb TT641.

55

La Fig. 7B es un gráfico que muestra que el pAb TT641 media la CCDA contra células que sobreexpresan FZD10. La citotoxicidad mediada por células contra células que sobreexpresan FZD10 a diversas proporciones de E:D, indican una posible correlación con la cantidad de pAb TT641 añadida el medio.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra que el pAb ejerce un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de xenoinjertos de SS. El crecimiento tumoral se evaluó como la proporción de volumen tumoral el día indicado con respecto al volumen calculado el día del tratamiento inicial en el grupo experimental (n=16) tratado con el pAb TT641(círculo negro) y en el grupo control (n=15) tratado con IgG de conejo no inmunizado (círculo blanco). El tratamiento continuó durante 5 días consecutivos (Días 0-4). Los datos se expresaron como media + DT.

60

Las Fig. 9A a 9L son fotografías que muestran un análisis TUNEL y de tinción inmunohistoquímica para Ki-67. Dos días después de acabar el tratamiento los tumores se extirparon y se fijaron en formaldehído al 10%. El análisis TUNEL y la tinción inmunohistoquímica para Ki-67, un indicador fiable de capacidad de proliferación

65

celular, se realizaron sobre los cortes en serie de especímenes incluidos en parafina de tumores tratados con anticuerpo de conejo no inmunizado (A, B, C, G, H e I) y pAb TT641 (D, E, F, J, K y L). En estas figuras, A, D, G y J = tinción HE; B, E, H y K = inmunotinción para Ki-67, y C, F, I y L = análisis TÚNEL. El aumento original de A-F = x 40; G-L = x 200; en L = x 400.

La Fig. 10A es una fotografía que muestra la expresión de *FZD10* de ratón en tejidos normales de ratón, detectada por análisis de transferencia de Northern de *FZD10* en ocho tejidos normales de ratón (corazón, cerebro, bazo, pulmón, músculo esquelético, riñón o testículo).

La expresión de β -actina se usó como control de carga.

Las Figs. 10B a 10E son fotografías que muestran tinción inmunohistoquímica en tejidos normales de ratón de riñón (B), placenta (C), pulmón (D) y cerebro (E) usando el pAb TT641.

Las Figs. 11A a 11E son fotografías que muestran el análisis de citometría de flujo usando los anti- mAb de *FZD10*, 1F2 (A), 1F4 (B), 5F2 (C), 5H4 (D) y 6C9 (E), en líneas de SS (SYO-1 y YaFuSS; paneles superiores) y en líneas celulares de cáncer de colon (SW480 y HT29; paneles inferiores). Las líneas de color gris muestran la expresión del antígeno de superficie celular *FZD10* detectado por cada mAb; las líneas de color negro representan las señales fluorescentes de las células incubadas con IgG de conejo no inmunizado como control negativo.

La Fig. 12 son fotografías que muestran el mapeo epitópico de los mAb, 1F2, 5F2, 5H4 y 6C9 con péptidos lineales de solapamiento sintéticos.

La Fig. 13 es un gráfico que muestra el efecto inhibitor del mAb 5F2 sobre el crecimiento en xenoinjertos de SS. El crecimiento tumoral se evaluó como la proporción del volumen tumoral el día indicado con respecto al volumen calculado el día del tratamiento inicial en el grupo experimental (5F2, n=5) tratado con los mAb (5F2, círculos blancos) y en el grupo control (n=6) tratado con IgG de conejo no inmunizado (círculos negros). El tratamiento continuó durante 10 días consecutivos (días 0-9; flechas). Los datos se expresan como media + DT.

5. Descripción detallada y realizaciones preferidas de la invención

La presente invención se refiere a un método para el tratamiento y/o la prevención en un sujeto de una enfermedad que está asociada con Frizzled homólogo 10 (*FZD10*) (enfermedad asociada con *FZD10*) y a un método para establecer el diagnóstico y/o el pronóstico de la enfermedad. Las composiciones útiles en estos métodos también se incluyen en el ámbito de la presente invención.

La presente invención se basa en los hallazgos de que el anticuerpo policlonal específico para *FZD10* (pAb TT641) y los anticuerpos monoclonales para *FZD10* (mAb) son eficaces mediando la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) contra células de SS que sobreexpresan *FZD10* e inhibiendo el crecimiento de xenoinjertos de SS, como se describe más adelante. Además, la presente invención se basa en los hallazgos de que *FZD10* se expresa específicamente en determinados tumores, incluyendo sarcoma sinovial, y de que estos tumores pueden detectarse usando el anticuerpo específico para *FZD10*.

5.1. Producción de un anticuerpo

En la presente invención pueden usarse anticuerpos que reaccionen específicamente contra una proteína *FZD10* derivada de una enfermedad asociada con *FZD10*. El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa una molécula de anticuerpo en conjunto, o a sus fragmentos, tales como fragmentos Fab, fragmentos $F(ab')_2$ y fragmentos Fv, que pueden unirse a la proteína o a sus péptidos parciales como el antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal. También puede ser un anticuerpo humanizado o quimérico o un anticuerpo Fv monocatenario (mcFv). Los anticuerpos (anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales) para usar en la presente invención pueden prepararse, por ejemplo, mediante los siguientes procesos.

5.1.1. Inmunógeno (antígeno)

Inicialmente, para la preparación de un anticuerpo útil en la presente invención, se prepara una proteína para uso como un inmunógeno (antígeno). La proteína *FZD10* o su péptido parcial se usan como una proteína inmunogénica. La secuencia de aminoácidos de la proteína *FZD10* usada como el inmunógeno en la presente invención y la secuencia de ADNc que codifica la proteína están disponibles públicamente en el GenBank con los N° de Acceso BAA84093 (SEC ID N°: 1) y AB027464 (SEC ID N°: 2), respectivamente. La proteína *FZD10* o su péptido parcial para usar como el inmunógeno pueden prepararse sintéticamente de acuerdo con un procedimiento conocido en la materia tal como un proceso de síntesis peptídica en fase sólida, usando la información de secuencia de aminoácidos disponible. El péptido parcial de la proteína *FZD10* usada como un inmunógeno se selecciona de e incluye, un péptido que contiene los restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, que corresponde al dominio extracelular N-terminal de la proteína *FZD10* (DEC-*FZD10*), péptidos que contienen los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, ó 214-225 de la proteína *FZD10* (SEC ID N°: 1) o al menos cinco restos, y preferentemente de seis a diez restos, de estas secuencias parciales. Como el inmunógeno en la presente invención se usa preferentemente un péptido que contiene los restos 214-225 de la proteína *FZD10* (SEC ID N°: 1).

La proteína o su péptido parcial también pueden prepararse usando la información de secuencia del ADNc que codifica la proteína FZD10 o su péptido parcial de acuerdo con un procedimiento recombinación de genes conocido. La producción de la proteína o de su péptido parcial, de acuerdo con tal procedimiento recombinación de genes, se ilustrará más adelante.

5 Para la producción de la proteína puede obtenerse un vector recombinante uniendo la secuencia de ADNc anterior con un vector apropiado. Puede obtenerse un transformante introduciendo el vector recombinante para la producción de la proteína en un hospedador de manera que la proteína FZD10 diana o su péptido parcial puedan expresarse.

10 Como vector, se usa un fago o un plásmido que sea capaz de replicarse autónomamente en un hospedador. Los ejemplos de un ADN de plásmido incluyen pET28, pGEX4T, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19, y otros ADN de plásmidos derivados de *Escherichia coli*; pUB110, pTP5, y otros ADN de plásmidos derivados de *Bacillus subtilis*; y YEp13, YEp24, YCp50 y otros ADN de plásmidos derivados de levaduras. Los ejemplos de un ADN de fagos incluyen los fagos lambda tales como λ gt11 y λ ZAP. Además, pueden usarse vectores de virus animales tales como vectores retrovirales y vectores de virus de vacunas y también pueden usarse vectores de virus de insectos tales como vectores de baculovirus.

20 El ADN que codifica la proteína FZD10 o su péptido parcial (en lo sucesivo en el presente documento denominado ADN de FZD10) se inserta en el vector, por ejemplo, mediante el siguiente método. En este método, una enzima de restricción apropiada escinde el ADN purificado y, para ligarse en el vector, se inserta en un sitio de restricción enzimática o en un sitio de multiclonación de un ADN de vector apropiado.

25 Además de un promotor y del ADN de FZD10, para la producción de proteínas para su uso en células de mamífero, en el vector recombinante pueden ligarse, si se desea, cualquiera de los potenciadores y otros elementos *cis*, señales de corte y empalme, señales de adición poli A, marcadores selectivos, sitios de unión al ribosoma (RBS) y otros elementos.

30 Para ligar el fragmento de ADN al fragmento del vector, puede usarse una ADN ligasa conocida. El fragmento de ADN y el fragmento del vector se hibridan y se ligan, produciendo así un vector recombinante para la producción de una proteína.

35 El hospedador para usar en la transformación no está específicamente limitado siempre que permita que la proteína FZD10 o su péptido parcial se expresen en su interior. Los ejemplos de hospedadores incluyen bacterias, por ejemplo, *E. coli*, y *Bacillus*; levaduras, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*; células animales, por ejemplo, células COS, células de Ovario de Hámster Chino (CHO) y células de insecto.

40 Por ejemplo, cuando como hospedador se usa una bacteria, el vector recombinante para la producción de la proteína debe ser preferentemente capaz de replicarse autónomamente en la bacteria hospedadora y comprender un promotor, un sitio de unión al ribosoma, el ADN de FZD10 y una secuencia de terminación de la transcripción. El vector recombinante puede comprender adicionalmente un gen para regular al promotor. Un ejemplo de *Escherichia coli* incluye *Escherichia coli* BRL, y un ejemplo de *Bacillus* es *Bacillus subtilis*. En el presente documento puede usarse cualquier promotor que pueda expresarse en el hospedador, tal como *Escherichia coli*.

45 El vector recombinante puede introducirse en la bacteria hospedadora mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la materia. Tales procedimientos incluyen, por ejemplo, un procedimiento que usa iones calcio y una electroporación.

50 Cuando como hospedador se usa una célula de levadura, una célula animal o una célula de insecto, puede producirse un transformante de acuerdo con un procedimiento conocido en la materia y después la proteína FZD10 o su péptido parcial puede producirse en el hospedador (transformante).

55 La proteína FZD10 o su péptido parcial, para su uso como el inmunógeno en la presente invención, pueden obtenerse a partir de un cultivo del transformante generado anteriormente. El "cultivo" se refiere a cualquier a de sobrenadante de cultivo, células cultivadas, microorganismos cultivados y homogeneizados de los mismos. El transformante se cultiva en un medio de cultivo mediante un proceso de cultivo de un hospedador convencional.

60 Para cultivar el transformante obtenido usando, como hospedador, *Escherichia coli*, levadura u otro microorganismo, el medio de cultivo puede ser un medio natural o un medio sintético, siempre que comprenda una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y otros componentes que puedan utilizar los microorganismos y que permita que el transformante se desarrolle eficazmente.

65 El transformante se cultiva generalmente sacudiendo el cultivo u oxigenando el cultivo con agitación en condiciones aerobias a una temperatura de 25 °C a 37 °C durante 3 a 6 horas. Durante el cultivo, el pH se lleva a un nivel casi neutro ajustando, por ejemplo, con un ácido inorgánico u orgánico y una disolución alcalina. Si fuera necesario, durante el cultivo, pueden añadirse al medio antibióticos, tales como ampicilina o tetraciclina, de acuerdo con el marcador selectivo insertado en el vector de expresión recombinante.

Después del cultivo, cuando la proteína FZD10 o su péptido parcial se producen dentro del microorganismo o la célula, la proteína o su péptido parcial se extraen homogeneizando el microorganismo o la célula. Cuando la proteína FZD10 o su péptido parcial se secretan del microorganismo o de la célula, el medio de cultivo se usa tal cual, o los restos del microorganismo o de las células se eliminan del medio de cultivo, por ejemplo, por centrifugación. Después de esto, la proteína FZD10 o su péptido parcial pueden aislarse del cultivo y purificarse mediante un método bioquímico convencional para el aislamiento y purificación de proteínas, tal como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en gel, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad, tanto individualmente como en combinación.

Puede confirmarse si la proteína FZD10 o su péptido parcial se han obtenido o no, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

A continuación, una vez obtenidos la proteína FZD10 o su péptido parcial se disuelven en un tampón para preparar un inmunógeno. Cuando sea necesario, a ello puede añadirse un adyuvante para una inmunización eficaz. Tales adyuvantes incluyen, por ejemplo, el adyuvante completo de Freund y el adyuvante incompleto de Freund disponibles en el mercado. Cualquiera de estos adyuvantes pueden usarse en solitario o en combinación.

5.1.2. Anticuerpo policlonal

Para preparar un anticuerpo policlonal, el inmunógeno preparado en la Sección 5.1.1. anterior se administra a un mamífero tal como un conejo, una rata o un ratón. De acuerdo con las necesidades puede usarse un adyuvante, tal como el adyuvante completo de Freund (ACF) o el adyuvante incompleto de Freund (AIF). La inmunización se realiza principalmente por inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. El intervalo de inmunización no se limita específicamente y el mamífero se inmuniza de una a 7 veces a intervalos de siete días a varias semanas. La titulación del anticuerpo se determina de 1 a 7 días después de la última inmunización, por ejemplo, mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), inmunoensayo enzimático (EIA), o radioinmunoensayo (RIA). Para obtener un antisuero, la sangre se extrae el día en que se mide la máxima titulación de anticuerpos. Después de esto, se mide la reactividad del anticuerpo policlonal en el antisuero, por ejemplo, mediante ELISA.

5.1.3. Anticuerpo monoclonal

El inmunógeno preparado en la Sección 5.1.1. anterior se administra a un mamífero tal como un conejo, una rata o un ratón. De acuerdo con las necesidades, puede usarse un adyuvante, tal como el adyuvante completo de Freund (ACF) o el adyuvante incompleto de Freund (AIF). La inmunización se realiza principalmente por inyección intravenosa, subcutánea o intraperitoneal. El intervalo de inmunización no se limita específicamente y el mamífero se inmuniza de una a 3 veces a intervalos que varían desde varios días a semanas. Las células productoras de anticuerpos se recogen de 1 a 7 días después de la última inmunización. Los ejemplos de células productoras de anticuerpos incluyen células pancreáticas, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica.

Para obtener un hibridoma, se fusiona una célula productora de anticuerpos y una célula de mieloma. Como célula de mieloma a fusionarse con la célula productora de anticuerpos, puede usarse una línea celular establecida generalmente disponible. Preferentemente, la línea celular usada debe poseer selectividad farmacológica y propiedades de manera que no pueda sobrevivir en un medio selectivo HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) en forma no fusionado y que pueda sobrevivir solamente cuando se fusiona con una célula productora de anticuerpos. Las células de mieloma posibles incluyen, por ejemplo, líneas celulares de mieloma de ratón tales como P3X63-Ag.8.U1 (P3U1) y NS-1.

Después, la célula de mieloma y la célula productora de anticuerpos se fusionan. Para la fusión, estas células se mezclan, preferentemente en la proporción de célula productora de anticuerpos con respecto a célula de mieloma de 5:1, en un medio de cultivo aséptico para células animales, tal como medio DMEM y RPMI-1640, y se fusionan en presencia de un agente promotor de fusión, tal como polietilenglicol (PEG). La fusión celular también puede realizarse usando un dispositivo de fusión celular disponible en el mercado que usa electroporación.

Después, tras el tratamiento de fusión anterior, el hibridoma se recupera de las células. Por ejemplo, se diluye apropiadamente una suspensión celular, por ejemplo, con el medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal y después se siembra en placas sobre una placa de microtitulación. A cada pocillo se añade un medio selectivo y las células se cultivan reemplazando apropiadamente el medio selectivo. Como resultado, las células que crecen aproximadamente 30 días después del inicio del cultivo en el medio selectivo pueden obtenerse como hibridoma.

Después, el sobrenadante de cultivo del hibridoma en crecimiento se explora para determinar la presencia de un anticuerpo que reaccione con la proteína FZD10 o con su péptido parcial. La exploración del hibridoma puede realizarse de acuerdo con un procedimiento convencional, por ejemplo, usando un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un inmunoensayo enzimático (EIA), o un radioinmunoensayo (RIA). Las células fusionadas se clonan por dilución limitante para establecer un hibridoma, que produce el anticuerpo monoclonal de interés.

El anticuerpo monoclonal puede recogerse del hibridoma establecido, por ejemplo, mediante un método de cultivo celular convencional o produciendo ascitis. Si fuera necesario, el anticuerpo puede purificarse en el método de recogida del anticuerpo descrito anteriormente de acuerdo con un procedimiento conocido tal como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de afinidad o una combinación de los mismos.

El tipo de globulina de los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención no está específicamente limitado, siempre que sea capaz de unirse específicamente a la proteína FZD10 y puede ser cualquiera de IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD. Entre estos, se prefiere IgG e IgM.

5.1.4. Otros anticuerpos

Adicionalmente, pueden usarse técnicas desarrolladas para la producción de "anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-608; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452-454). Estas implican cortar y empalmar los de una molécula de anticuerpo de ratón de especificidad antigénica apropiada junto con genes de una molécula de anticuerpo humana de actividad biológica apropiada. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que partes diferentes derivan de especies animales diferentes, tales como las que poseen una región variable derivada de un mAb murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo "anticuerpos humanizados".

Como alternativa, técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente de Estados Unidos N° 4.946.778; Bird, 1988, Science 242: 423-426; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883; y Ward et al., 1989, Nature 334: 544-546) pueden adaptarse para producir anticuerpos monocatenarios contra la proteína FZD10 o un péptido de la misma. Los anticuerpos monocatenarios se forman por la unión de fragmentos de cadena ligera y pesada de la región Fv mediante un puente aminoacídico, dando como resultado un polipéptido monocatenario. También pueden usarse técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en *E. coli* (Skerra et al., 1988, Science 242: 10381041).

5.1.5. Fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen específicamente una parte (epítipo) una proteína de interés pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero sin limitación, los fragmentos F (ab')₂ que pueden producirse por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y los fragmentos Fab que pueden generarse por reducción de puentes disulfuro de los fragmentos F (ab')₂.

Como alternativa, pueden construirse bibliotecas de expresión de Fab (Huse et al., 1989, Science, 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y fácil de fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

5.2. Usos terapéuticos

A continuación se describen métodos y composiciones farmacéuticas para el tratamiento y/o prevención del sarcoma sinovial usando el anticuerpo de la presente invención. La consecuencia de un tratamiento es producir, en un sujeto tratado, al menos un beneficio saludable, que en el caso de tumores, incluye, pero sin limitación, la remisión de los tumores, el alivio de los síntomas tumorales y el control de la propagación metastásica tumoral.

Específicamente, el método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada con FZD10 en un sujeto de acuerdo con la presente invención comprende administrar, a un sujeto que lo necesite, el anticuerpo o el fragmento descrito anteriormente (véase, Sección 5.1.).

El término "sujeto", en el presente documento, se refiere a un sujeto ha sufrido una enfermedad asociada con FZD10 y también a un sujeto que se sospecha que posee una enfermedad asociada con FZD10. En la presente invención, el sujeto pueden ser animales que incluyen animales mamíferos y aves. Por ejemplo, los mamíferos pueden incluir seres humanos, ratones, ratas, monos, conejos y perros.

En el presente documento, la expresión "enfermedad asociada con FZD10" se refiere a una enfermedad asociada con la sobreexpresión de la proteína FZD10. Específicamente, la enfermedad asociada con FZD10 es sarcoma sinovial (SS).

5.2.1. Composiciones farmacéuticas

El anticuerpo descrito en el presente documento puede administrarse a un sujeto a dosis eficaces para tratar o prevenir el sarcoma sinovial. Una dosis eficaz se refiere a la cantidad de un anticuerpo suficiente para dar como resultado un beneficio saludable en el sujeto tratado. A continuación se describen las formulaciones y métodos de administración que pueden emplearse con las composiciones farmacéuticas que contienen un anticuerpo de la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas, para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden formularse de manera convencional usando uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables.

5 Los anticuerpos pueden formularse para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) por inyección, por ejemplo, mediante inyección en embolada o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos acuosos u oleaginosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Como alternativa, el anticuerpo puede estar en forma de polvo liofilizado para la
10 constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes del uso.

5.2.2. Dosis y vía de administración

15 La toxicidad y eficacia terapéutica del anticuerpo de la presente invención puede determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o en animales experimentales, por ejemplo, para determinar la DL50 (la dosis letal para el 50% de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población). La proporción dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y puede expresarse como la proporción DL/DE.

20 Se prefieren anticuerpos que presenten índices terapéuticos altos. Aunque pueden usarse anticuerpos que presenten efectos secundarios tóxicos, hay que tener cuidado de diseñar un sistema de administración que dirija tales anticuerpos al sitio del tejido afectado para minimizar el posible daño a células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos secundarios.

25 Los datos obtenidos de los ensayos de cultivo celulares y de estudios animales pueden usarse en la formulación de una diversidad de dosificaciones para el uso en seres humanos. La dosificación de tales anticuerpos se encuentra preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones en plasma circulantes que incluyen la DE50 con escasa o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación empleada y de la vía de administración utilizada. Para cualquier anticuerpo usado en el método de la invención, la
30 dosis eficaz puede calcularse inicialmente a partir de ensayos de cultivo celular. En modelos animales puede formularse una dosis para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluya la CI50 (es decir, la concentración del anticuerpo de ensayo que consigue una inhibición máxima de los síntomas al 50%) determinada en el cultivo celular. Dicha información puede usarse para determinar de manera más precisa dosis útiles en seres humanos. Los niveles en plasma pueden medirse, por ejemplo, por cromatografía líquida de alto
35 rendimiento.

Al mismo tiempo, dependiendo de las afecciones y de la edad del sujeto y/o vía de administración, un experto en la materia puede seleccionar una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en tal cantidad que el anticuerpo de
40 acuerdo con la presente invención se administra al sujeto en un día en una cantidad de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 μg por kg de peso corporal del sujeto, y preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 μg por kg de peso corporal del sujeto. El intervalo y los tiempos de administración pueden seleccionarse considerando la afección y edad del sujeto, la vía de administración y la respuesta de la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede administrarse al sujeto de una a 5 veces,
45 preferentemente 1 vez al día durante 5 a 10 días.

La composición farmacéutica puede administrarse por vía sistémica o local. Preferentemente se administra en forma de administración direccionable para administrar el componente activo en el sitio afectado.

50 5.2.3. Terapia de combinación

En realizaciones particulares, los métodos y composiciones de la presente invención se usan para el tratamiento o prevención de sarcoma sinovial junto con uno o una combinación de agentes quimioterapéuticos que incluyen, pero
55 sin limitación, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatino, carboplatino, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarrubicina, daunorrubicina, dactinomomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel y docetaxel.

Con respecto a la radioterapia, puede usarse cualquier protocolo de radioterapia dependiendo del tipo de enfermedad asociada con FZD10 a tratar. Por ejemplo, pero sin limitación, puede administrarse radiación de rayos X. También pueden administrarse, radioisótopos que emiten rayos gamma, tales como isótopos radiactivos de radio,
60 cobalto u otros elementos, a tejidos de exposición.

En otra realización, se administra quimioterapia o radioterapia, preferentemente al menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes y más preferentemente varios meses (por ejemplo hasta tres meses) después del uso de los métodos y composiciones que contienen el anticuerpo de la presente invención. La quimioterapia o radioterapia administrada antes, simultáneamente con, o después del tratamiento usando los métodos y
65 composiciones de acuerdo con la presente invención pueden administrarse mediante cualquiera de los métodos

conocidos en la materia.

5.3. Usos de diagnóstico y pronóstico

5 Los anticuerpos dirigidos contra la proteína FZD10 o fragmentos peptídicos de la misma en la Sección 5.1.2. también pueden usarse como diagnóstico y pronóstico, como se describe en el presente documento. Dichos métodos de diagnóstico pueden usarse para detectar la presencia o ausencia de sarcoma sinovial y el riesgo de padecer la enfermedad. El método para el diagnóstico y/o pronóstico del sarcoma sinovial de la presente invención comprende detectar o determinar inmunológicamente la proteína FZD10 derivada de la enfermedad en una muestra
10 que usa un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención. Específicamente, un método para el diagnóstico o pronóstico del sarcoma sinovial o de una predisposición a desarrollar la enfermedad en un sujeto de acuerdo con la presente invención comprende:

- 15 (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo contra la proteína FZD10 o un fragmento de la misma;
- (b) detectar la proteína FZD10 en la muestra; y
- (c) evaluar si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar la enfermedad basándose en la abundancia relativa de la proteína FZD10 en comparación con un control.

20 El método para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención puede realizarse basándose en cualquiera de los procedimientos, siempre que este sea un ensayo que use un anticuerpo, es decir un ensayo inmunológico. Por tanto, la proteína FZD10 puede detectarse usando el anticuerpo o un fragmento del mismo de la presente invención como el anticuerpo usado en el ensayo. Por ejemplo, la proteína FZD10 puede detectarse usando una tinción inmunohistoquímica, un inmunoensayo tal como inmunoensayos enzimáticos (ELISA y EIA), un ensayo
25 inmunofluorescente, un radioinmunoensayo (RIA), o transferencia de Western.

Una muestra a ensayar en el método para determinar el diagnóstico y/o pronóstico del sarcoma sinovial de la presente invención no está limitada específicamente, siempre que esta sea una muestra biológica que pueda contener la proteína FZD10 derivada del sarcoma sinovial. Los ejemplos de la muestra incluyen extracto de una
30 célula u órgano, cortes tisulares, así como sangre, suero, plasma, sobrenadante de linfocitos cultivado, orina, líquido espinal, saliva, sudor y ascitis. La abundancia de la proteína FZD10 determinada en muestras tales como tejido tumoral, biopsia tumoral y tejido metastásico usando el anticuerpo o un fragmento del mismo de la presente invención es específicamente útil como un índice del sarcoma sinovial.

35 Por ejemplo, para detectar cuantitativa o cualitativamente la proteína FZD10, pueden usarse los anticuerpos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la presente invención, tales como los descritos anteriormente en la Sección 5.1. Adicionalmente, para la detección *in situ* de la proteína FZD10, los anticuerpos (o fragmentos de los mismos) de la presente invención pueden emplearse histológicamente, así como en microscopía inmunofluorescente o inmunoelectrónica. La detección *in situ* puede conseguirse extrayendo una muestra histológica de un sujeto, tal
40 como cortes de tejidos incluidos en parafina (tales como especímenes quirúrgicos) y aplicando a los mismos un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento del mismo) se aplica preferentemente recubriendo una muestra con el anticuerpo (o fragmento del mismo) marcado. Usando la presente invención, los expertos en la materia percibirán fácilmente que, para conseguir tal detección *in situ*., puede modificarse cualquiera de una amplia diversidad de métodos histológicos (tales como procedimientos de tinción).

45 Los inmunoensayos para la proteína FZD10 comprenderán típicamente incubar una muestra de un sujeto a examinar, tal como líquido biológico, un extracto tisular, células recién recogidas o lisados de células que se han incubado en cultivo celular, en presencia de un anticuerpo de la presente invención marcado de manera detectable y detectar el anticuerpo unido mediante cualquiera de una diversidad de técnicas bien conocidas en la materia.

50 La muestra puede ponerse en contacto con e inmovilizarse sobre un soporte o vehículo en fase sólida tal como nitrocelulosa u otro soporte sólido que sea capaz de inmovilizar células, partículas celulares o proteínas solubles. El soporte puede después lavarse con tampones adecuados seguido de tratamiento con el anticuerpo marcado de manera detectable contra FZD10. El soporte en fase sólida puede después lavarse con el tampón una segunda vez para eliminar el anticuerpo no unido. La cantidad de anticuerpo unido sobre el soporte sólido puede después
55 detectarse mediante medios convencionales.

La expresión "soporte o vehículo en fase sólida" significa cualquier soporte que sea capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Los expertos en la materia conocerán muchos vehículos adecuados para la unión de anticuerpos o antígenos o serán capaces de establecer los mismos mediante el uso de experimentación rutinaria.
60

La actividad de unión de un lote proporcionado de anticuerpos anti-FZD10 puede determinarse de acuerdo con métodos bien conocidos. Para cada determinación, los expertos en la materia podrán determinar condiciones de ensayo operativas y óptimas empleando experimentación rutinaria.

65 Para detectar fácilmente una reacción entre el anticuerpo (o su fragmento) de la presente invención y la proteína FZD10 derivada de un lugar afectado por sarcoma sinovial, la reacción puede detectarse directamente marcando el

anticuerpo de la presente invención o detectarse indirectamente usando un segundo anticuerpo secundario marcado. En el método de la presente invención, para una mejor sensibilidad, se usa preferentemente el último procedimiento de detección indirecta, tal como un ensayo de tipo sándwich o un ensayo ELISA competitivo.

5 Son ejemplos de marcadores para usar en el presente documento los siguientes. En un inmunoensayo enzimático pueden usarse peroxidasas (POD), fosfatasas alcalinas, β -galactosidasa, ureasa, catalasa, glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, amilasas y complejos de biotina-avidina. En un ensayo inmunofluorescente puede usarse isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de tetrametilrodamina (TRITC), isotiocianato de rodamina sustituido e isotiocianato diclorotiacina. En un radioinmunoensayo puede usarse tritio, ^{125}I y, ^{131}I . En un ensayo
10 inmunoluminiscente puede usarse el ensayo luciferasa NADH- FMNH₂, el sistema luminol-hidrógeno-peróxido-POD, ésteres de acridinio y compuestos de dioxetano.

El marcador puede unirse a anticuerpo de acuerdo con un procedimiento convencional. Por ejemplo, el marcador puede unirse al anticuerpo mediante un método con glutaraldehído, un método con maleimida, un método con piridil disulfuro o un método con peryodato en el inmunoensayo enzimático y mediante un método con cloramina T o el método de Bolton-Hunter en el radioinmunoensayo.

El ensayo puede realizarse de acuerdo con un procedimiento conocido (Ausubel, F. M. et al. Eds., Short Protocols in Molecular Biology, Capítulo 11 "Immunology" John Wiley & Sons, Inc. 1995).

Por ejemplo, cuando el anticuerpo de la presente invención marca directamente con el marcador descrito anteriormente, la muestra se pone en contacto con el anticuerpo marcado para formar así un complejo entre la proteína FZD10 y el anticuerpo. Después, el anticuerpo marcado no unido se separa, y el nivel de la proteína FZD10 en la muestra puede determinarse basándose en la cantidad del anticuerpo marcado unido o en la del anticuerpo
25 marcado no unido.

Cuando se usa un anticuerpo secundario marcado, el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con la muestra en una reacción primaria, y el complejo resultante se deja reaccionar con el anticuerpo secundario marcado en una segunda reacción. La reacción primaria y la reacción secundaria pueden realizarse en orden inverso, simultáneamente con el mismo intervalo de tiempo entre las mismas. Las reacciones primaria y secundaria producen un complejo de [proteína FZD10]-[el anticuerpo de la invención]-[el anticuerpo secundario marcado] o un complejo de [el anticuerpo de la invención] - [proteína FZD10]-[el anticuerpo secundario marcado]. El anticuerpo secundario marcado no unido se separa después y el nivel de la proteína FZD10 en la muestra puede determinarse basándose en la abundancia del anticuerpo secundario marcado unido o en la del anticuerpo secundario marcado no unido.

A continuación se ilustrará una de las realizaciones preferidas de la presente invención. Inicialmente el anticuerpo de la presente invención, como un anticuerpo primario, se pone en contacto con una muestra tal como un corte tisular. La unión no específica del anticuerpo primario se bloquea después usando un reactivo de bloqueo conocido. Después, la muestra se pone en contacto con un anticuerpo secundario marcado que reacciona con el anticuerpo primario (el anticuerpo de la presente invención) en un sitio diferente al de una proteína FZD10. Las señales procedentes del marcador se detectan después.

El "anticuerpo secundario que reacciona con el anticuerpo primario en un sitio diferente al de una proteína FZD10" para su uso en el presente documento no se limita específicamente, siempre que sea un anticuerpo que reconozca un sitio distinto del sitio de unión entre el anticuerpo primario y la proteína FZD10. El anticuerpo secundario que acaba de mencionarse anteriormente puede ser cualquiera de anticuerpos policlonales, antisuero, y anticuerpos monoclonales, así como fragmentos de estos anticuerpos tales como fragmento Fab, fragmento F (ab')₂ y fragmento Fab'. El anticuerpo secundario puede ser una mezcla de dos o más tipos de anticuerpos.

Por tanto, en la muestra de un sujeto se determina la abundancia de la proteína FZD10 y, basándose en la abundancia relativa de la proteína FZD10, cuando sea necesario, puede evaluarse si el sujeto padece o no o está en riesgo de desarrollar sarcoma sinovial, en comparación con un control, incluyendo la abundancia de la proteína en una muestra normal o una muestra de un tejido en el que la proteína FZD10 no se expresa. Como es evidente para los expertos en la materia, la abundancia de la proteína FZD10 varía dependiendo de la afección, el sexo, la edad y de otros factores en cada sujeto. Por consiguiente, la presencia de la enfermedad o el riesgo de la misma pueden determinarse preferentemente comparando la abundancia de la proteína FZD10 en la muestra con la abundancia en una muestra normal o una muestra de un tejido en el que la proteína FZD10 no se expresa y determinar la diferencia entre las dos muestras. Para realizar un pronóstico, es también eficaz comparar la abundancia de la proteína FZD10 en la muestra con la abundancia en una muestra recogida cuando sujeto ha padecido un tumor primario.

De acuerdo con otra realización, el anticuerpo de la presente invención se marca con un radioisótopo y el anticuerpo marcado se administra por vía parenteral a un sujeto. Por tanto, la localización de un tumor primario y el tumor de sarcoma sinovial metastatizado relacionado puede encontrarse rápidamente de una manera no invasiva. Dicho método de diagnóstico se conoce como formación de imágenes de tumores y un experto en la materia puede comprender fácilmente estos procedimientos. El anticuerpo marcado puede administrarse al sujeto por vía sistémica o local, preferentemente mediante una vía parenteral tal como inyección intravenosa, inyección intramuscular,

inyección intraperitoneal, o inyección subcutánea.

5.3.1. KITS

- 5 Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención reaccionan específicamente con una proteína FZD10, como se ha mencionado anteriormente, y pueden por tanto usarse en kits para el diagnóstico y/o pronóstico del sarcoma sinovial.

10 El kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención comprende un anticuerpo de la presente invención descrito en la Sección 5.1. Detectando la proteína FZD10 en una muestra procedente de un sujeto que se sospecha que padece sarcoma sinovial con el uso del kit para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención, tanto si el sujeto padece como si no una enfermedad asociada con FZD10, puede confirmarse rápida y fácilmente. Los kits para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades que usan dichas reacciones inmunológicas son muy conocidos y un experto en la materia puede seleccionar fácilmente los componentes apropiados distintos del anticuerpo. Los kits para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención pueden usarse en cualquier medio, siempre que este sea un medio para inmunoensayo.

6. Ejemplos

20 La presente invención se ilustrará adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes:

Ejemplo 1

Proteína recombinante y anticuerpo policlonal

25 Usando el sistema de expresión pET28 (Novagen, Madison, WI), se produjo en *E. coli* la proteína recombinante del dominio extracelular N-terminal de FZD10 (DCE-FZD10; restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1), fusionada con una etiqueta de His. Resumiendo, la expresión de la proteína se indujo mediante isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,5 mM por incubación a 25 °C durante 3 h y después, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se purificó con la resina Ni-NTA (QIAGEN, Valencia, CA). Los conejos se inmunizaron con la proteína recombinante purificada (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japón) y después se purificó el antisuero de mayor titulación usando el soporte Affi-Gel 15 (BioRad, Hercules, CA), que se acopló con la proteína recombinante DCE-FZD10 en una solución de acoplamiento (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8,0). El anticuerpo unido al gel se eluyó de la columna en glicina 0,1 M (pH 2,5) y se neutralizó inmediatamente en Tris 1 M (pH 8,5). La calidad y especificidad del anticuerpo policlonal purificado por afinidad (en lo sucesivo el presente documento denominado "pAb TT641"), se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con SDS y transferencia de Western.

Ejemplo 2

Expresión de FZD10

(1) Preparación de líneas celulares y especímenes tisulares.

45 Se cultivaron líneas celulares de SS (HS-SY-2, YaFuSS y SYO-1), líneas celulares de cáncer de colon (SW480, LoVo, DLD1, HT29, HCT116, SNU-C4 y SNU-C5), una línea celular de adenocarcinoma cervical (HeLa), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), y COS7 en monocapas en un medio apropiado complementado con suero bovino fetal al 10% y solución de antibiótico al 1% / antimicótico (Sigma, St Louis, MO) y se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con aire que contenía CO₂ al 5%. Inmediatamente después de la resección, las muestras tumorales se congelaron instantáneamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80 °C hasta la preparación del ARN. También se fijaron especímenes quirúrgicos en formalina al 10% y se procesaron rutinariamente para la inclusión en parafina. El bloque de parafina se seccionó finamente en serie hasta un grosor de 5 μ m y se tiñó con HE (hematoxilina eosina) para la evaluación patológica. Para el análisis, el comité de ética de la Facultad de Medicina, Universidad de Kyoto, dio el visto bueno de todas las muestras.

55 (2) Análisis de transferencia de Northern

60 Los ARN totales se extrajeron de las líneas celulares y de los especímenes quirúrgicos congelados preparados en el apartado (1) anterior usando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Después de tratamiento con DNasa I (Nippon Gene, Osaka, Japón), el ARNm se aisló con Micro-FastTrack (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. sobre un gel de agarosa desnaturalizante al 1% se separó una alícuota de 1 μ g de cada ARNm, junto con ARN poli A (+) de tejido normal humano aislado del corazón, cerebro, pulmón, hígado, riñón, médula ósea, páncreas y placenta (Clontech, Palo Alto, CA), y se transfirió a una membrana de nailon. La hibridación con una sonda de ADNc de FZD10 marcada con cebador al azar α ³²P-dCTP se realizó de acuerdo con las instrucciones para el sistema de marcación de ADN Megaprime (Amersham Bioscience). La prehibridación, hibridación y lavado se realizaron de acuerdo con las recomendaciones del proveedor. Las

transferencias se auto radiografiaron con pantallas intensificadoras a -80 °C durante tres días.

El análisis de transferencia de Northern reveló que, entre los tejidos adultos humanos normales, el nivel más alto de FZD10 se expresó en la placenta (Figura 1A), lo que concordaba con un informe previo (Koike, J. et al., Biochem Biophys Res Commun. 262: 39-43., 1999). En comparación con el nivel de transcritos en placenta, el gen FZD10 se expresó en las líneas celulares de SS (HS-SY-2 y YaFuSS) y especímenes de SS quirúrgicos (SS487 y SS582) a niveles mucho más elevados. Estos hallazgos indican que la transcripción de FZD10 aumenta en células tumorales de SS.

Ejemplo 3

Reconocimiento específico del dominio extracelular de FZD10 por pAb TT641

(1) Transferencia de Western

Los autores de la presente invención generaron el anticuerpo policlonal que reconoce el dominio extracelular N terminal de FZD10 (DEC-FZD10) (véase el Ejemplo 1). Para investigar la especificidad del anticuerpo del DEC-FZD10 (pAb TT641) purificado por afinidad, se realizaron análisis de transferencia de Western de la siguiente manera:

Para disolver por completo proteínas de células completas, se recogieron células adherentes en tampón de muestra Laemmli (BioRad), se realizó la lisis con ultrasonido y se llevó a ebullición durante 5 minutos. Cada muestra se cargó sobre un gel de SDS-PAGE al 10%, se transfirió sobre una membrana de nitrocelulosa (Amersham Bioscience) y se incubó a 4 °C durante una noche a 0,1 µg/ml de pAb TT641. Después de 1 hora de incubación con inmunoglobulina anti-conejo conjugada con HRP (Amersham Bioscience), las señales se visualizaron usando un reactivo quimioluminiscente reforzado (ECL) (Amersham Bioscience). Como un control de carga para proteínas, el anti-β-actina monoclonal AC-15 (Sigma), detectó la β-actina.

Como resultado, en las líneas celulares que expresaban FZD10, se observó claramente una sola banda de 68-kDa del tamaño previsto compatible con FZD10 (Figura 2A). Sin embargo, dado que los tamaños de las otras proteínas de la familia del gen FZD son similares a los de la proteína FZD10, se pudo examinar adicionalmente, mediante PCR semicuantitativa en TR, si la banda única reconocida por el pAb TT641 era específica para la proteína FZD10, de la siguiente manera.

(2) PCR semicuantitativa en TR

Usando cebadores oligo (dT) 12-18 y Superscript II (Invitrogen), para los ADNc monocatenarios, se realizó la transcripción inversa de una alícuota de 3 µg de ARN total preparado procedente de cada línea celular. La PCR semicuantitativa en TR se realizó con los cebadores específicos para cada miembro de la familia FZD o con un cebador específico de β2-microglobulina (p32MG) como control interno.

Las secuencias de cebadores se indican en la Tabla 1.

Tabla 1 Secuencias de cebadores de la familia del gen FZD

	Cebador D	Cebador I
FZD1	5'-CTCGAGGTTTCCTCACTAGACAA-3' (SEC ID N°: 3)	5'-AATGGTTAAACCGCCCTAAATAA-3' (SEC ID N°: 4)
FZD2	5'-TCCACCTTCTCACTGTACC-3' (SEC ID N°: 5)	5'-TAAATACGGAGTCTGTAGGGGC-3' (SEC ID N°: 6)
FZD3	5'-ATTGAATAGGCCTGATCATCTGA-3' (SEC ID N°: 7)	5'-ATAGGAGCGTAGAGTGCACAAAG-3' (SEC ID N°: 8)
FZD4	5'-ATGACTTACAGATCCCCGAC-3' (SEC ID N°: 9)	5'-ACAGAGCAGGGGAAGTCACAT-3' (SEC ID N°: 10)
FZD5	5'-CTGCGCTTCTTCCTATGCACTA-3' (SEC ID N°: 11)	5'-TTGTTGTAGAGCGGGTGTGACT-3' (SEC ID N°: 12)
FZD6	5'-CGCTACTTTGTACTCTTGCCACT-3' (SEC ID N°: 13)	5'-ACATGGGATATGGTACTGACGAC-3' (SEC ID N°: 14)
FZD7	5'-GCGAGGCGCTCATGAACAAGT-3' (SEC ID N°: 15)	5'-CACGGCCACCATGAAGTAGCA-3' (SEC ID N°: 16)
FZD8	5'-GACACTTGATGGGCTGAGGTTTC-3' (SEQ ID D10: 17)	5'-TAAGTCAGGGGTGGGAGTTTAC-3' (SEC ID N°: 18)
FZD9	5'-CTGCACGCTGGTCTTCTACT-3' (SEC ID N°: 19)	5'-CCGATCTTGACCATGAGCTTC-3' (SEC ID N°: 20)
FZD 10	5'-TCAGAAACCCTTCAGTGCTACAT-3' (SEC ID N°: 21)	5'-ATACACACGCAGAAACCACTCTT-3' (SEC ID N°: 22)

Cebador D	Cebador I
Cebador D o I; secuencias de cebadores directos o inversos, respectivamente	

Los resultados se muestran en la Figura 2B. El modelo de expresión observado en la transferencia de Western (Figura 2A) se compararon con los niveles de transcritos en 10 miembros de la familia FZD usando diversas líneas celulares (Figura 2B). Como se muestra en las Figuras 2A y 2B, el modelo de expresión detectado con transferencia de Western usando el pAb TT641 era muy similar al de los transcritos de FZD10 revelados por PCR semicuantitativa en TR entre 10 miembros de la familia FZD, especialmente en las líneas celulares HeLa y LoVo. Este descubrimiento indica que el pAb TT641 reconoce el epítipo específico de FZD10 pero no el de otros miembros de la familia del gen FZD.

10 Ejemplo 4

Localización de FZD10 en células

15 (1) Inmunocitoquímica

Para examinar la localización subcelular de la proteína FZD10, se realizaron análisis inmunocitoquímicos. Inicialmente se establecieron células COS7-FZD10 (S5, S9, S10, S3 y S11) que sobreexpresaban de manera estable FZD10 transfectando una construcción de expresión de pCAGGS-FZD10-Myc-His en células COS7 (Figura 3A).

20 En primer lugar, la secuencia codificante completa del ADNc de FZD10 se amplificó mediante PCR-TR usando ADN polimerasa KOD-Plus (TOYOBO, Osaka, Japón) y se insertó en el sitio EcoRI único del vector de expresión de mamífero pCAGGS, que incluye un promotor CAG (híbrido de β -actina de pollo - potenciador temprano inmediato de citomegalovirus) (Niwa, H. et al, Gene. 108: 193-9., 1991) y un gen que confiere resistencia a neomicina. Las etiquetas del epítipo Myc e His se colocaron en el extremo C del vector de expresión (pCAGGS-FZD10-Myc-His). Las construcciones se confirmaron mediante secuenciación de ADN con cebadores directo e inverso; directo, 5'-GTCCCCTTCTCCATCTCCAG-3' (SEC ID N°: 23); inverso, 5'-TATTTGTGAGCCAG-GGCATT-3' (SEC ID N°: 24).

30 Después, se sembraron células COS7 a una densidad de 5×10^4 células por placa de seis pocillos. Después de 24 horas, las células se transfecaron con 2 μ g de una mezcla de pCAGGS-FZD10-Myc-His preincubada durante 15 minutos con 6 μ l de reactivo de transfección FuGene6 (Roche, Basilea, Suiza). Después de un periodo de cultivo de tres semanas en medio selectivo que contenía 0,4 mg/ml de Geneticina (Invitrogen), se establecieron transfectantes estables.

35 Los transfectantes estables derivados de COS7 que expresaban FZD10 se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS y después se cubrieron con solución de bloqueo (BSA al 3%) durante 1 hora a temperatura ambiente. Para minimizar la lisis celular, no se realizó permeabilización con detergentes. Después las células se incubaron con anticuerpo anti-c-myc (9E10, diluido 1:1000) y con pAb TT641 (2 μ g/ml) en solución de bloqueo a 4 °C durante una noche. Los anticuerpos primarios se tiñeron con anticuerpos fluorescentes secundarios anti-conejo de cabra (Alexa Flour 488; se diluyeron 1:500, Molecular Probes) y los anticuerpos secundarios anti-ratón de caballo conjugados con Rojo Texas (diluido 1:1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA), durante 1 hora a temperatura ambiente, se tiñeron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se visualizaron con un microscopio ECLIPSE E 600 (Nikon, Tokio, Japón). Para detectar los modelos de expresión endógenos de FZD10, las líneas celulares de SS (HS-SY-2 y YaFuSS) también se inmunotiñeron con fluorescencia con 2 μ g/ml de pAb TT641 de la misma manera.

45 Cuando las células y COS7-FZD10 se tiñeron con colorante de contraste con anticuerpo anti-myc conjugado con Rojo Texas, la señal roja coincidió con la verde del pAb TT641 (Fig. 3B), lo que apoya la unión específica del pAb TT641 a FZD10. Adicionalmente, el análisis inmunocitoquímico usando el pAb TT641 reveló que los modelos de expresión endógenos observados en líneas celulares de SS (HS-SY-2 y YaFuSS) eran similares a los de los transfectantes estables (Fig. 3C). La razón por la cual FZD10 se tiñe en un patrón de manchas en el citoplasma sigue siendo incierta, sin embargo se sabe que la proteína FZD10 antes citada es un receptor de siete dominios transmembrana (Koike, J. et al., Biochem Biophys Res Commun. 262: 39-43., 1999). Presumiblemente, el antígeno de superficie celular maduro aparece en concentraciones relativamente bajas y en inmunocitoquímica pueden detectarse abundantes antígenos no procesados en el citoplasma.

55 (2) Análisis de citometría de flujo

Para abordar la cuestión de la localización subcelular planteada en la sección de inmunocitoquímica, se realizó análisis de citometría de flujo.

60 Se recogieron 5×10^6 células por digestión con tripsina y se incubaron con 1,5 μ g de pAb TT641 e IgG de conejo no inmunizado (DAKO, Kyoto, Japón) a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar 3 veces con PBS, a la suspensión celular se añadieron 2 μ g de IgG anti-ratón fluorescente (Alexa Fluor 488, Molecular Probe) y se incubó a 4 °C

durante 30 minutos. Inmediatamente después de lavar tres veces con PBS, las células se analizaron mediante un FACScan (Becton Dickinson, San Jose, CA).

Tres líneas celulares de SS, YaFuSS, HS-SY-2 y SYO-1, se marcaron específicamente con el pAb TT641 (Fig. 4), mientras que no se detectaron señales de fluorescencia en las líneas SW480, HT29, o LoVo. Estas observaciones se correlacionaron con los niveles de expresión de FZD10 observados en las transferencias de Northern (véase, Ejemplo 1, Figura 1B). Considerados en su conjunto, estos hallazgos indican que el pAb TT641 reconoce específicamente el antígeno de superficie celular de FZD10, pero no cualquier otro de los miembros de FZD (Figs. 2A y 2B), tanto en condiciones naturales como desnaturalizantes.

Ejemplo 5

Mapeo epitópico del pAb TT641

Para caracterizar la especificidad del pAb TT641, inicialmente se realizó un mapeo epitópico usando el sistema MANCHA (SPOT) de la siguiente manera:

Se sintetizó una serie de péptidos lineales de 10 restos solapantes por un aminoácido y se cubrió toda la secuencia del DEC-FZD10 (restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1) y se unió covalentemente a una membrana de celulosa mediante la técnica de síntesis MANCHA (SPOTs; Sigma Genosys). De acuerdo con las recomendaciones del fabricante, la membrana que contenía 216 manchas peptídicas se preincubó durante 8 horas a temperatura ambiente con un tampón de bloqueo (Sigma) y se hibridó con el pAb TT641 en el tampón de bloqueo a 4 °C durante una noche. La membrana se lavó con Tween 20 al 0,05%/TBS (Tris 50 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM, pH 8,0), seguido de 2 horas de incubación de antiinmunoglobulina anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (HRP) (Amersham Bioscience) en el tampón de bloqueo a temperatura ambiente. Después de tres lavados con Tween 20 al 0,05%/TBS, las manchas se visualizaron con una solución de revelado de señales (Sigma) que contenía 3-amino-9-etilcarbazol.

Como resultado, el pAb TT641 reconoció 6 epítomos diferentes del DCE-FZD10 a un grado diferente (Fig. 5). Entre ellos, el pAb TT641 mostró la mayor reactividad para el epítomo que variaba de 214-225 restos, que se pensó que representaba una secuencia crítica para la unión específica del pAb TT641 al DEC-FZD10.

Ejemplo 6

Modelo de expresión de la proteína FZD10

(1) Tinción inmunohistoquímica

Para investigar si el pAb TT641 podría reconocer específicamente a la proteína FZD10 en cortes tisulares, inicialmente se realizaron análisis inmunohistoquímicos en tejidos humanos normales de adulto y en especímenes quirúrgicos de SS usando el pAb TT641.

Sobre un portaobjetos cubierto con silano, se colocaron cortes de cada serie de los especímenes incluidos en parafina, se desparafinaron en xileno y se rehidrataron en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después los cortes se procesaron para la recuperación del antígeno por tratamiento con microondas. Después de inactivar la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3%, la unión no específica de los anticuerpos primarios se bloqueó con un reactivo de bloqueo (DAKO). Los portaobjetos se incubaron después a 4 °C durante una noche con pAb TT641 a 5 µg/ml. Posteriormente, se añadió Reactivo Polimérico ENVISION de conejo (DAKO) como anticuerpo secundario durante una reacción de 60 minutos a temperatura ambiente. Finalmente la inmunoreacción se visualizó con tetrahidrocloruro de 3, 3'-diaminobencidina (DAKO) en sustrato de peroxidasa. Los cortes se tñeron con tinción de contraste usando hematoxilina, se deshidrataron en alcoholes de manera gradual, se aclararon en xileno y se cubrieron con cubreobjetos. Se procesaron controles negativos en paralelo sustituyendo el anticuerpo específico por IgG de conejo normal no inmunizado (DAKO). Los portaobjetos de tejidos normales humanos de adulto incluidos en parafina se adquirieron en DAKO y BioChain (Hayward, CA), y se inmunotñeron de la misma manera a la mencionada anteriormente.

A diferencia de la tinción positiva para FZD10 en placenta (Fig. 6A), no se detectó expresión de FZD10 por inmunotinción con pAb TT641 en cinco cortes de tejidos diferentes de cerebro normal (Fig. 6B), corazón (Fig. 6C), pulmón (Fig. 6D) o hígado (Fig. 6E), como se esperaba a partir de las transferencias de Northern (véase, Ejemplo 2, Fig. 1A). Sin embargo, en riñón normal se observó tinción positiva en los túbulos distales y proximales y en los túbulos colectores (Fig. 6F), aunque el grado de intensidad de tinción varió entre individuos (Fig. 6G). En tejidos normales de estómago, se observó una fuerte inmunoreactividad en la parte superior de las glándulas gástricas, pero la intensidad de tinción fue mucho más débil en las células localizadas en la parte inferior de las glándulas (Figs. 6H y 6I). En tejidos normales de colon las células epiteliales también mostraron inmunoreactividad apenas visible de FZD10 en la parte superior de las criptas, pero se detectó una fuerte intensidad de tinción en la superficie de las vellosidades (Fig. 6J). Por otro lado, se observó una fuerte expresión de FZD10 en un modelo citoplásmico en

células tumorales de SS del espécimen de SS bifásico (Figs. 6K y 6L). Cabe destacar que la intensidad de tinción fue especialmente fuerte en células tumorales epiteliales, mientras que células tumorales fusiformes no epiteliales apenas se observó inmunoreactividad. Estos datos sugieren que los niveles de expresión de la proteína FZD10 también estaban ausentes o eran bajos en órganos vitales normales, en comparación con la expresión aumentada en tejidos de SS. Además, células de cáncer de colon en lesiones primarias y metastásicas también se inmunotifieron específicamente con el pAb TT641, pero no pudieron detectarse señales en los tejidos estromales y hepáticos circundantes (Figs. 6M, 6N y 6O).

Ejemplo 7

El pAb TT641 media CCDA contra células de SS que expresan FZD10

Para examinar adicionalmente si el pAb TT641 induce citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCAD) contra células de SS, se midió la liberación de LDH de células de SS después de la lisis celular.

La citotoxicidad se evaluó por medición cuantitativa de la lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citosólica estable que se libera después de la lisis celular, usando un Ensayo de Citotoxicidad no radioactivo CytoTox96 (Promega, Madison, WI). Para la preparación de células efectoras recientes, se aislaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de sangre periférica heparinizada de un donante sano mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll-Paque (Amersham Bioscience). Siguiendo las instrucciones del fabricante, las células efectoras (E) y las células diana (D) (5×10^3 /pocillo) se incubaron conjuntamente a diversas proporciones de E:D junto con el pAb TT641 o IgG de conejo no inmunizado en 100 μ l de medio RPMI 11640 sin rojo fenol complementado con FBS al 5% en una placa de 96 pocillos de fondo redondo, por cuadruplicado durante 6 horas a 37 °C. La LDH liberada en el sobrenadante del cultivo (50 μ l) se midió mediante un ensayo colorimétrico, que da como resultado la conversión de una sal de tetrazolio al producto formazán rojo. Los datos de absorbancia a 490 nm se recogieron con un lector de placa de 96 pocillos convencional. Después de corregir los datos para las señales de fondo, se calculó el porcentaje de citotoxicidad específica de acuerdo con la fórmula: % de citotoxicidad = $100 \times (\text{liberación experimental de LDH} - \text{liberación espontánea de LDH de células efectoras} - \text{liberación espontánea de LDH de células diana}) / (\text{liberación máxima de LDH de células diana} - \text{liberación espontánea de LDH de células diana})$. Los controles incluyeron la incubación de células diana o efectoras con pAb TT641.

Como se muestra en la Figura 7A, cuando las células diana y las células efectoras se incubaron conjuntamente con 7 μ g/ml (0,7 μ g/pocillo) de pAb TT641 a una proporción de E:D de 25:1, no hubo efectos citotóxicos en la línea celular diana (SYO-1) solo con pAb TT641 (D +Ab) y no hubo indicios de interacción citotóxica entre el pAb TT641 y las células efectoras humanas (E +Ab) o entre las células diana y las células efectoras humanas (D + E). Por otro lado, se observaron efectos citotóxicos cuando las células diana se incubaron con el anticuerpo y con las células efectoras humanas (D+E+Ab). Incluso cuando las células diana se incubaron con diferentes concentraciones de pAb TT641 en diferentes proporciones de E:D, la citotoxicidad solo se indujo cuando el anticuerpo y las células humanas efectoras se añadían al mismo tiempo.

Como se muestra en la Figura 7B, 1 μ g del pAb TT641 indujo un 78% de la citotoxicidad mediada por células contra células que sobreexpresan FZD10 a una proporción de E:D de 25:1. Este efecto citotóxico se correlacionó positivamente con las proporciones de E:D y la cantidad del anticuerpo añadido. No hubo CCDA significativa inducida por el anticuerpo de control contra las células diana. Estos resultados sugieren la posibilidad de que el pAb TT641 contra FZD10 podría mostrar un efecto inhibitorio sobre el crecimiento para tumores que sobreexpresan FZD10 mediante CCDA.

Ejemplo 8

Efecto inhibitorio sobre el crecimiento del pAb TT641 en xenoinjertos de SS

En este ejemplo, para examinar el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del pAb TT641 en xenoinjertos de SS se inocularon células SYO-1 a ratones por vía subcutánea.

El trabajo realizado con los animales se realizó en una instalación para animales de acuerdo con el reglamento institucional. Se usaron ratones atímicos hembra de 6 semanas de vida (BALB/cA *Jc1-nu*). Los ratones se aclimataron y se enjaularon en jaulas estériles en grupos de 3 en campanas de flujo laminar en una sala a temperatura controlada con un programa de 12 horas de luz/12 horas de oscuridad, y se alimentaron con pienso esterilizado con autoclave y agua a voluntad.

Para los implantes celulares, se cultivaron células SYO-1 en monocapas, se realizó la digestión con tripsina y se resuspendieron en medio asérico. La concentración final se ajustó a 5×10^7 células/ml y la suspensión celular se puso en hielo. Después de limpiar el sitio con etanol, en los costados de los ratones desnudos, se inyectaron 0,1 ml (5×10^6 células) de la suspensión por vía subcutánea. Los tumores se midieron con un calibrador con marcador y los volúmenes se determinaron usando la fórmula: $0,5 \times (\text{diámetro mas grande}) \times (\text{diámetro más pequeño})^2$. Cuando los tumores primarios tuvieron un tamaño de 40-75 mm³, los animales se dividieron al azar en dos grupos. Un grupo (n

= 16) recibió una inyección intratumoral de 10 µg del pAb TT641 como una suspensión en 75 µl de PBS durante 5 días consecutivos (Días 0-4). Como control, el otro grupo (n = 15) recibió IgG de conejo no inmunizado (DAKO). El crecimiento tumoral se evaluó calculando la proporción de crecimiento basándose en el volumen tumoral el día indicado con respecto al volumen calculado al inicio del tratamiento.

Como se muestra en la Figura 8, el crecimiento de xenoinjertos SS se atenuó mediante tratamiento con pAb TT641, en comparación con tratamiento con IgG de conejo no inmunizado. Seis días después del inicio de la inyección del anticuerpo, la tasa de crecimiento de los xenoinjertos de SS en los ratones tratados con pAb TT641 fue significativamente menor que la observada en los controles negativos ($P = 1,71 \times 10^{-5}$; ensayo de t de Student).

Para aclarar la razón de la atenuación del crecimiento por tratamiento con TT641, los autores de la presente invención realizaron el análisis TUNEL.

Se sacrificaron ratones en el momento indicado, se recogieron los tumores y se fijaron con formaldehído al 10%. Para el ensayo de marcado del extremo libre por dUTP mediado por transferasa terminal (TUNEL) realizado *in situ*, se tiñó uno de los cortes en serie de los especímenes incluidos en parafina usando el Kit de Detección de Apoptosis ApopTag (Intergen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Además, para evaluar la capacidad de proliferación celular, se realizó tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-Ki-67 (MIB-1, DAKO) de la misma manera que se ha mencionado en el apartado de tinción inmunohistoquímica.

El espécimen de tejidos tumorales tratados con pAb TT641 mostró agrupaciones de células apoptóticas (Figs. 9F y 9L), que eran negativas para la tinción por un marcador de proliferación celular, Ki-67 (Figs. 9E y 9K), mientras que en especímenes tumorales de controles negativos había escasas células apoptóticas (Figs. 9C y 9I). Dado que las células apoptóticas en el tejido tumoral estaban rodeadas de muchas células tumorales viables, que eran positivas para la tinción con Ki-67 (Figs. 9E y 9K), se pensó que el efecto inhibitor sobre el crecimiento del pAb TT641 en xenoinjertos de SS era insuficiente para disminuir drásticamente los tumores.

Ejemplo 9

Expresión de FZD10 de ratón en tejidos normales de ratón

Dado que se descubrió que la identidad de aminoácidos entre la FZD10 humana y la FZD10 de ratón era aproximadamente del 93% se investigó, por transferencia de Northern y análisis inmunohistoquímico, si el pAb TT641 podría reaccionar también en cruzado con la proteína FZD10 de ratón usando tejidos normales de ratón. Aunque el análisis de transferencia de Northern demostró que no se detectaban bandas en tejidos normales de ratón de corazón, cerebro, bazo, pulmón, hígado, músculo esquelético, o testículos (Fig. 10A), el análisis inmunohistoquímico mostró que se observaba tinción positiva en tejidos de ratón de riñón (Fig. 10B) y de placenta (Fig. 10C), así como en tejidos humanos normales y se observó una débil inmunoreactividad en pulmón de ratón normal (Fig. 10D), pero no se observó en cerebro (Fig. 10E).

Ejemplo 10

Generación de anticuerpos monoclonales (mAb)

Se obtuvieron anticuerpos monoclonales anti-FZD10 (mAb 1F2, 1F4, 5F2, 5H4 y 6C9) de la siguiente manera:

Para inmunizar a tres ratones BALB/c de 6 semanas de vida, se usó una proteína recombinante DCE-FZD10 (restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1) (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japón). Se inyectaron 100 mg del antígeno (proteína recombinante DEC-FZD10) emulsionados en adyuvante completo de Freund en las almohadillas de las patas de cada ratón, seguido de tres inyecciones intraperitoneales a intervalos de 3 días. Dos días después de una inoculación de refuerzo de 100 mg de antígeno en 150 ml de adyuvante completo de Freund, se realizó la fusión celular y la clonación por dilución limitante de la siguiente manera. Se fusionaron un total de seis nódulos linfáticos procedentes de un ratón seleccionado con células de mieloma P3-U1 y los hibridomas se seleccionaron con medio HAT (H1 - FCS/RPMI/HAT/BM al 15%). Después de aproximadamente 2 semanas desde la fusión, se exploraron los sobrenadantes de las células mediante ensayo ELISA usando como antígeno DCE-FZD10 recombinante. Se clonaron 42 hibridomas positivos (DO450 en ELISA > 0,1) dos veces por dilución limitante y se seleccionaron adicionalmente mediante análisis de citometría de flujo usando la línea celular de SS, YaFuSS. Eventualmente, se seleccionaron cinco clones sencillos como hibridomas productores de anticuerpos monoclonales. El isotipo de cadena pesada de cada clon se identificó por ELISA y la concentración de anticuerpo monoclonal se determinó por inmunodifusión. Para producir grandes cantidades de mAb, se administraron 5×10^5 células de hibridoma clonadas en líquido ascítico en ratones BALB/c. Tras 10 días a 2 semanas después de la administración, el líquido ascítico se recogió y se agrupó.

Ejemplo 11Especificidad de anticuerpos anti-FZD10 monoclonales (mAb)

5 (1) Especificidad para la proteína FZD10

En primer lugar se examinó la especificidad de los mAb obtenidos en el Ejemplo 10 mediante análisis de citometría de flujo usando las líneas celulares de SS (SYO-1 y YaFuSS) que mostraron alta expresión del transcrito de FZD10 y las líneas celulares de cáncer de colon (SW480 y HT29) que apenas mostraron expresión detectable. Todos estos mAb podrían reconocer específicamente la proteína FZD10 como antígeno de superficie en SYO-1 o YaFuSS, mientras que no se detectaron señales de fluorescencia en SW480 ni en HT29 (Figs. 11A (1F2), 11B(1F4), 11C(5F2), 11D(5H4), 11E(6C9)). Estos resultados concuerdan con los obtenidos usando el pAb TT641, como se describe en el Ejemplo 4. Considerados en su conjunto, estos resultados indican que los mAb anti-FZD10 también reconocen específicamente el dominio extracelular de FZD10 en condiciones naturales.

15 (2) Mapeo epitópico

Para caracterizar adicionalmente la especificidad de cada mAb, se realizó un mapeo epitópico de la misma manera que la indicada en el Ejemplo 5.

Una serie de péptidos sintéticos lineales de 10 restos solapantes por un aminoácido y cubriendo todo el DCE-FZD10 se unió covalentemente a una membrana de celulosa (SPOT; Sigma Genosys, Woodlands, Texas) como se describe en el Ejemplo 5. La membrana que contenía 216 manchas peptídicas se hibridó con los mAb anti-FZD10 (1F2, 5F2, 5H4 y 6C9) a 4 °C durante una noche. Después de incubación con IgG anti-conejo conjugado con HRP (Amersham Bioscience, Piscataway, New Jersey), las manchas se visualizaron con 3-amino-9-etilcarbazol.

Como resultado, los mAb 1F2, 5F2, 5H4 y 6C9 reconocieron los restos de aminoácidos 157-170 (EPTRGSGLFPPLFR), 157-170 (EPTRGSGLFPPLFR), 161-173 (GSGLFPPLFRPQR), 156-169 (DEPTRGSGLFPPLF) en el DCE-FZD10 (restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1), respectivamente (Figura 12).

EJEMPLO 12Inhibición del crecimiento de xenoinjertos de SS por el mAb 5F2

Se realizaron experimentos *in vivo* en la instalación de animales de los autores de la presente invención también de acuerdo con el reglamento institucional. Se inyectaron, por vía subcutánea, 0,1 ml de una suspensión de células SYO-1 (5×10^6 células) en los costados de ratones hembra atímicos de seis semanas de vida (BALB/cA Jcl-nu). Los volúmenes tumorales se determinaron usando la fórmula: $0,5 \times (\text{diámetro mas grande}) \times (\text{diámetro más pequeño})^2$. Cuando los xenoinjertos tuvieron un tamaño de 40-75 mm³, los animales se dividieron al azar en dos grupos. Un grupo recibió inyección intratumoral de 50 µg de los mAb, 5F2 (n = 5), durante 10 días consecutivos, respectivamente. Como un control, el otro grupo (n = 6) recibió IgG de conejo no inmunizado (DAKO). El crecimiento tumoral se evaluó calculando la proporción de volumen tumoral el día indicado con respecto al volumen calculado al inicio del tratamiento.

Para confirmar el efecto de inhibición sobre crecimiento del pAb TT641 en xenoinjertos de SS, se examinó si los mAb anti-FZD10, 5F2 y 1F2 mostraban efecto antitumoral en xenoinjertos de SS. El crecimiento de xenoinjertos de SS se atenuó por tratamiento con el mAb 5F2, en comparación con el tratamiento con IgG de conejo no inmunizado (Fig. 13). El día 10 después del inicio del tratamiento con el anticuerpo (como indican las flechas en la Figura 13), la tasa de crecimiento de xenoinjertos de SS en ratones tratados con los mAb 5F2 fue significativamente menor que la observada en los controles negativos (Fig. 13). Estos hallazgos indican que es probable que el mAb 5F2 inhiba el crecimiento tumoral de células de SS.

LISTADO DE SECUENCIAS

55 <110> ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.
JAPAN AS REPRESENTED BY PRESIDENT OF THE UNIVERSITY OF TOKIO

60 <120> MÉTODO PARA TRATAR EL SARCOMA SINOVIAL

<130> PH-1999-PCT

<140> US 60/486.195

<141> 11-07-2003

65 <160> 24

ES 2 381 841 T3

<170> PatentIn versión 3.1

5 <210> 1
<211> 581
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 1

Met Gln Arg Pro Gly Pro Arg Leu Trp Leu Val Leu Gln Val Met Gly
1 5 10 15

Ser Cys Ala Ala Ile Ser Ser Met Asp Met Glu Arg Pro Gly Asp Gly
20 25 30

Lys Cys Gln Pro Ile Glu Ile Pro Met Cys Lys Asp Ile Gly Tyr Asn
35 40 45

Met Thr Arg Met Pro Asn Leu Met Gly His Glu Asn Gln Arg Glu Ala
50 55 60

Ala Ile Gln Leu His Glu Phe Ala Pro Leu Val Glu Tyr Gly Cys His
65 70 75 80

ES 2 381 841 T3

Gly His Leu Arg Phe Phe Leu Cys Ser Leu Tyr Ala Pro Met Cys Thr
 85 90 95

Glu Gln Val Ser Thr Pro Ile Pro Ala Cys Arg Val Met Cys Glu Gln
 100 105 110

Ala Arg Leu Lys Cys Ser Pro Ile Met Glu Gln Phe Asn Phe Lys Trp
 115 120 125

Pro Asp Ser Leu Asp Cys Arg Lys Leu Pro Asn Lys Asn Asp Pro Asn
 130 135 140

Tyr Leu Cys Met Glu Ala Pro Asn Asn Gly Ser Asp Glu Pro Thr Arg
 145 150 155 160

Gly Ser Gly Leu Phe Pro Pro Leu Phe Arg Pro Gln Arg Pro His Ser
 165 170 175

Ala Gln Glu His Pro Leu Lys Asp Gly Gly Pro Gly Arg Gly Gly Cys
 180 185 190

Asp Asn Pro Gly Lys Phe His His Val Glu Lys Ser Ala Ser Cys Ala
 195 200 205

Pro Leu Cys Thr Pro Gly Val Asp Val Tyr Trp Ser Arg Glu Asp Lys
 210 215 220

Arg Phe Ala Val Val Trp Leu Ala Ile Trp Ala Val Leu Cys Phe Phe
 225 230 235 240

Ser Ser Ala Phe Thr Val Leu Thr Phe Leu Ile Asp Pro Ala Arg Phe
 245 250 255

ES 2 381 841 T3

Arg Tyr Pro Glu Arg Pro Ile Ile Phe Leu Ser Met Cys Tyr Cys Val
 260 265 270

Tyr Ser Val Gly Tyr Leu Ile Arg Leu Phe Ala Gly Ala Glu Ser Ile
 275 280 285

Ala Cys Asp Arg Asp Ser Gly Gln Leu Tyr Val Ile Gln Glu Gly Leu
 290 295 300

Glu Ser Thr Gly Cys Thr Leu Val Phe Leu Val Leu Tyr Tyr Phe Gly
 305 310 315 320

Met Ala Ser Ser Leu Trp Trp Val Val Leu Thr Leu Thr Trp Phe Leu
 325 330 335

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser
 340 345 350

Tyr Phe His Leu Ala Ala Trp Ala Ile Pro Ala Val Lys Thr Ile Leu
 355 360 365

Ile Leu Val Met Arg Arg Val Ala Gly Asp Glu Leu Thr Gly Val Cys
 370 375 380

Tyr Val Gly Ser Met Asp Val Asn Ala Leu Thr Gly Phe Val Leu Ile
 385 390 395 400

Pro Leu Ala Cys Tyr Leu Val Ile Gly Thr Ser Phe Ile Leu Ser Gly
 405 410 415

Phe Val Ala Leu Phe His Ile Arg Arg Val Met Lys Thr Gly Gly Glu
 420 425 430

ES 2 381 841 T3

Asn Thr Asp Lys Leu Glu Lys Leu Met Val Arg Ile Gly Leu Phe Ser
435 440 445

Val Leu Tyr Thr Val Pro Ala Thr Cys Val Ile Ala Cys Tyr Phe Tyr
450 455 460

Glu Arg Leu Asn Met Asp Tyr Trp Lys Ile Leu Ala Ala Gln His Lys
465 470 475 480

Cys Lys Met Asn Asn Gln Thr Lys Thr Leu Asp Cys Leu Met Ala Ala
485 490 495

Ser Ile Pro Ala Val Glu Ile Phe Met Val Lys Ile Phe Met Leu Leu
500 505 510

Val Val Gly Ile Thr Ser Gly Met Trp Ile Trp Thr Ser Lys Thr Leu
515 520 525

Gln Ser Trp Gln Gln Val Cys Ser Arg Arg Leu Lys Lys Lys Ser Arg
530 535 540

Arg Lys Pro Ala Ser Val Ile Thr Ser Gly Gly Ile Tyr Lys Lys Ala
545 550 555 560

Gln His Pro Gln Lys Thr His His Gly Lys Tyr Glu Ile Pro Ala Gln
565 570 575

Ser Pro Thr Cys Val
580

<210> 2
<211> 2811
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 2

ES 2 381 841 T3

acacgtccaa cgccagcatg cagegcccgg gccccgcct gtggctggtc ctgcaggiga 60
 tgggctcgtg cgccgccatc agctccatgg acatggagcg cccgggcgac ggcaaatgcc 120
 agccccatga gatccccgatg tgcaaggaca teggtacaa catgactcgt atgccccaac 180
 tgatgggcca cgagaaccag cgcgaggcag ccatccagtt gcacgagttc gcgccgctgg 240
 tggagtacgg ctgccacggc cacctccgct tcttctgtg ctgctgtac gcgccgatgt 300
 gcaccgagca ggtctctacc cccatccccg cctgccgggt catgtgcgag caggccccgc 360
 tcaagtgtc cccgattaig gagcagttca acttcaagtg gcccgactcc ctggactgcc 420
 ggaaactccc caacaagaac gacccccact acctgtgcat ggaggcgccc aacaacggct 480
 cggacgagcc caccgggggc tcgggcctgt tcccgcgct gttccggccg cagcggcccc 540
 acagcgcga ggagcaccgg ctgaaggacg ggggccccgg gcgcggcggc tgcgacaacc 600
 cgggcaagtt ccaccacgtg gagaagagcg cgtcgtgcgc gccgctctgc acgcccggcg 660
 tggacgtgta ctggagccgc gaggacaagc gcttcgcagt ggtctggctg gccatctggg 720
 cgggtcgtg ctctctctcc agcgcctca ccgtgctcac ctctctatc gacccggccc 780
 gcttcgcta ccccgagcgc cccatcatct tctctccat gtgctactgc gtctactccg 840
 tgggtacct catccgctc ttgccggcg ccgagagcat gcctgcgac cgggacagcg 900
 gccagctcta tgtcatccag gagggactgg agagcaccgg ctgcacgtg gtcttctgg 960
 tctctacta ctteggcatg gccagctcgc tgtgggtgggt ggtctcacg ctccacctgg 1020
 tcttgccgc cggcaagaag tggggccacg aggccatga agccaacagc agctacttcc 1080
 acctggcagc ctgggccatc ccggcgggta agaccatct gatcctggtc atgcgcaggg 1140

ES 2 381 841 T3

tggcggggga cgagctcacc ggggtctgct acgtgggcag catggacgtc aaecgcctca 1200
 ccggcttcgt gctcattccc ctggcctgct acctggteat cggcacgtcc ttcacccctc 1260
 cgggcttcgt ggcctgttc cacatccgga gggatgatgaa gacgggcggc gagaacacgg 1320
 acaagctgga gaagctcatg gtgcgtatcg ggcctctctc tgtgctgtac acctgtccgg 1380
 ccacctgtgt gatgcctgc tacttttacg aacgcctcaa catggattac tggaagatcc 1440
 tggcggcgca gcacaagtgc aaaatgaaca accagactaa aacgctggac tgctgatgg 1500
 ccgcctccat ccccgccgig gagatcttca tggatgaagat ctttatgctg ctgggtgggg 1560
 ggatcaccag cgggatgtgg atttggacct ccaagactct gcagtcctgg cagcaggtgt 1620
 gcagccgtag gtaaagaag aagagccgga gaaaaccggc cagcgtgatc accagcggtg 1680
 ggatttaca aaaagcccag catccccaga aaactacca cgggaaatat gagatccctg 1740
 cccagtcgcc cacctgcgtg tgaacagggc tggaggggaag ggcacagggg cgcgccggagc 1800
 taagatgtgg tgcttttctt ggttgtgttt ttctttcttc ttcttttttt ttttttttt 1860
 ataaaagcaa aagagaaata cataaaaaag tgtttaccct gaaattcagg atgctgtgat 1920
 aactgaaag gaaaaatgta cttaaagggt tttgtttgt tttggttttc cagcgaaggg 1980
 aagctctcc agtgaagtag cctcttgtgt aactaattg tggtaaagta gttgattcag 2040
 cctcagaag aaaacttttg tttagagccc tccgtaaata tacatctgtg taittgagtt 2100
 ggctttgcta cccatttaca aataagagga cagataactg ctttgcaaat tcaagagcct 2160
 cccctgggtt aacaaatgag ccatccccag ggcccacccc caggaaggcc acagtgtctg 2220
 gcggcatccc tgcagaggaa agacaggacc cggggcccgc ctccaccccc agtggatttg 2280
 gagttgctta aaatagactc tggccttcac caatagtctc tetgcaagac agaaacctcc 2340
 atcaaacctc acatttgiga actcaaacga tgtgcaatac attttttct ctttccttga 2400
 aaataaaaag agaacaagt atttictat atataaagac aacaaaagaa atctcctaac 2460

ES 2 381 841 T3

aaaagaacta agaggcccag ccctcagaaa cccttcagtg ctacattitg tggettttta 2520
 atggaaacca agccaatggt atagacgttt ggactgatit gtggaaagga ggggggaaga 2580
 gggagaagga tcattcaaaa gttacccaaa gggcttattg actcittcta ttgttaaaca 2640
 aatgatitcc acaaacagat caggaagcac taggttggca gagacacttt gtctagtgt 2700
 ttctcttcac agtgccagga aagagtgggt tctgcgtgtg tatatttgta atatatgata 2760
 tttttcatgc tccactattt tattaataat aaaatatggt ctttaaaaaa a 2811

5 <210> 3
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 3
 ctcgaggtt ctcactaga caa 23

15 <210> 4
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 4
 aatggtaaa cggccctaaa taa 23

25 <210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

35 <400> 5
 tccacctct tactgtcac c 21

40 <210> 6
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 6
 taaaatacgg agtctgtagg ggc 23

<210> 7
 <211> 23
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 5
 <400> 7
 attgaatagg cctgatcatc tga 23
 <210> 8
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15
 <400> 8
 ataggagcgt agagtcaca aag 23
 <210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25
 <400> 9
 atgacttaca gatccccga c 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35
 <400> 10
 acagagcagg ggaagtcaca t 21
 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 11
 ctgcttct tcctatcac ta 22
 <210> 12
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 12
 ttgtttaga gcgggtgga ct 22
 <210> 13
 <211> 23
 <212> ADN
 60
 65

<213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 5
 <400> 13
 cgctactttg tactcttgcc act 23
 <210> 14
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15
 <400> 14
 acatgggata tggactgac gac 23
 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25
 <400> 15
 gcgaggcgct catgaacaag t 21
 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35
 <400> 16
 cacggccacc atgaagtagc a 21
 <210> 17
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 17
 gacactgat gggctgaggt tc 22
 <210> 18
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 18
 taagtcaggg gtaggagttt ac 22
 <210> 19
 <211> 21
 <212> ADN
 60
 65

<213> Artificial
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 5
 <400> 19
 ctgcacgctg gtcttcctac t 21
 <210> 20
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 15
 <400> 20
 ccgatcttga ccatgagctt c 21
 <210> 21
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 25
 <400> 21
 tcagaaaccc ttcagtgcta cat 23
 <210> 22
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 35
 <400> 22
 atacacacgc agaaaccact ctt 23
 <210> 23
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 45
 <400> 23
 gtccccttct ccatctccag 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> oligonucleótido sintético
 55
 <400> 24
 tatttggag ccagggcatt 20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína Frizzled homólogo 10 (FZD10), para usar en un método de tratamiento o prevención de sarcoma sinovial.
2. Un método *in vitro* de diagnóstico o pronóstico de sarcoma sinovial, o de una predisposición a desarrollar sarcoma sinovial en un sujeto, que comprende:
- 10 (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína FZD10;
- (b) detectar la proteína FZD 10 en la muestra; y
- (c) evaluar si el sujeto padece o no, o corre el riesgo de desarrollar sarcoma sinovial basándose en la abundancia relativa de la proteína FZD10 en comparación con un control.
- 15 3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal o monoclonal.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo se suscita contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161 -173, 174-191, 189-202, 214-225 o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1.
- 20 5. Una composición farmacéutica para usar en el tratamiento o prevención de sarcoma sinovial, que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se suscita contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-169, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225 o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce otros miembros de la familia de la proteína FZD.
- 25 6. Un kit para el diagnóstico o pronóstico de sarcoma sinovial, que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que se suscita contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-159, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225 o 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, en la que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce otros miembros de la familia de la proteína FZD.
- 30 7. Un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo dirigido contra la proteína Frizzled homólogo 10 (FZD10), que se suscita contra un péptido que comprende al menos los restos 43-56, 61-72, 156-159, 157-170, 157-172, 161-173, 174-191, 189-202, 214-225 o 1-225 de una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1, en la que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo reconoce específicamente la proteína FZD10 y no reconoce otros miembros de la familia de la proteína FZD.
- 35 8. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de la reivindicación 7, que se dirige contra un péptido que consiste en los restos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEC ID N°: 1.
- 40 9. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo del mismo de la reivindicación 7 u 8, que es un anticuerpo policlonal o monoclonal.
- 45

Fig. 1

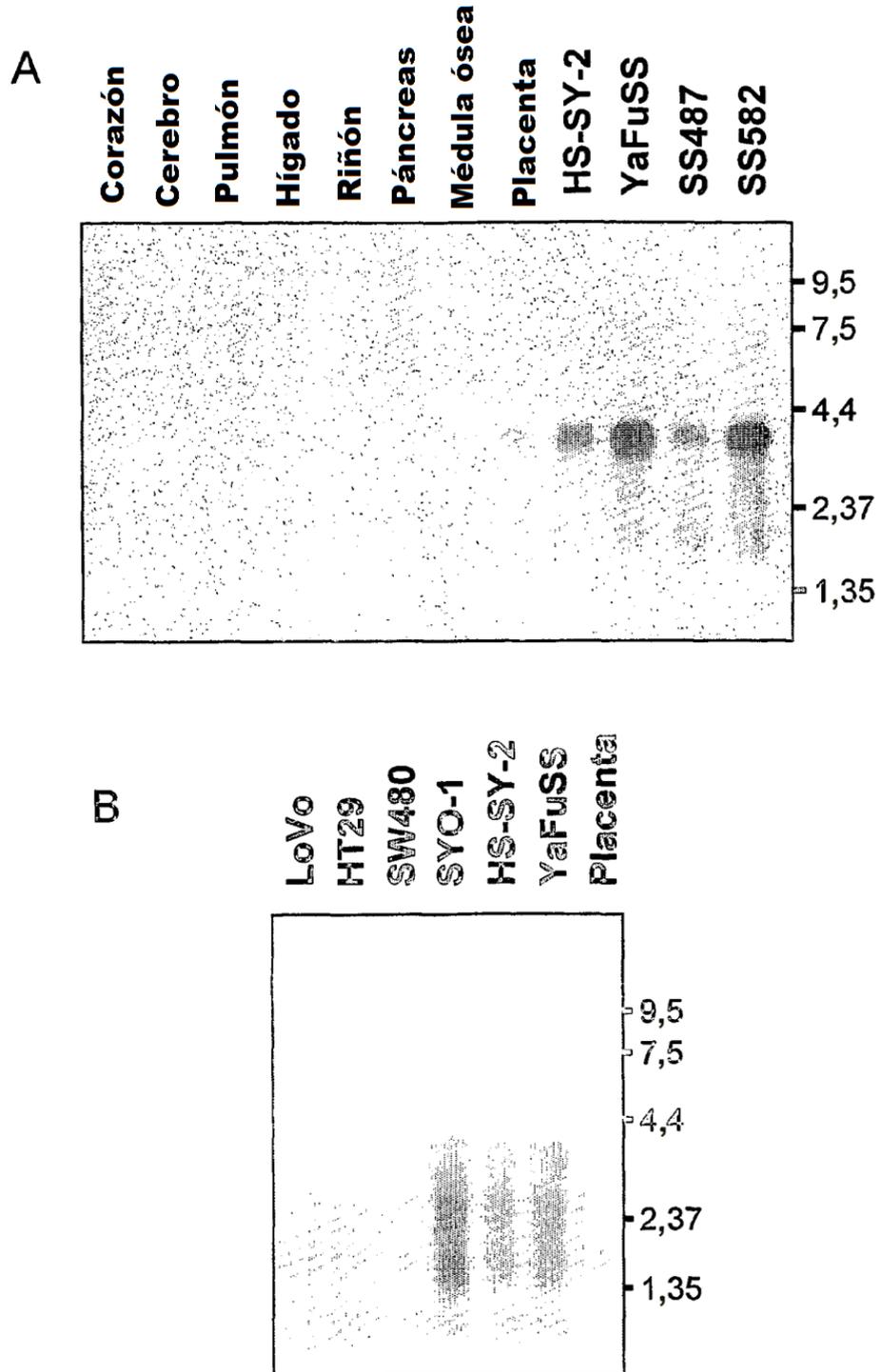


Fig. 2

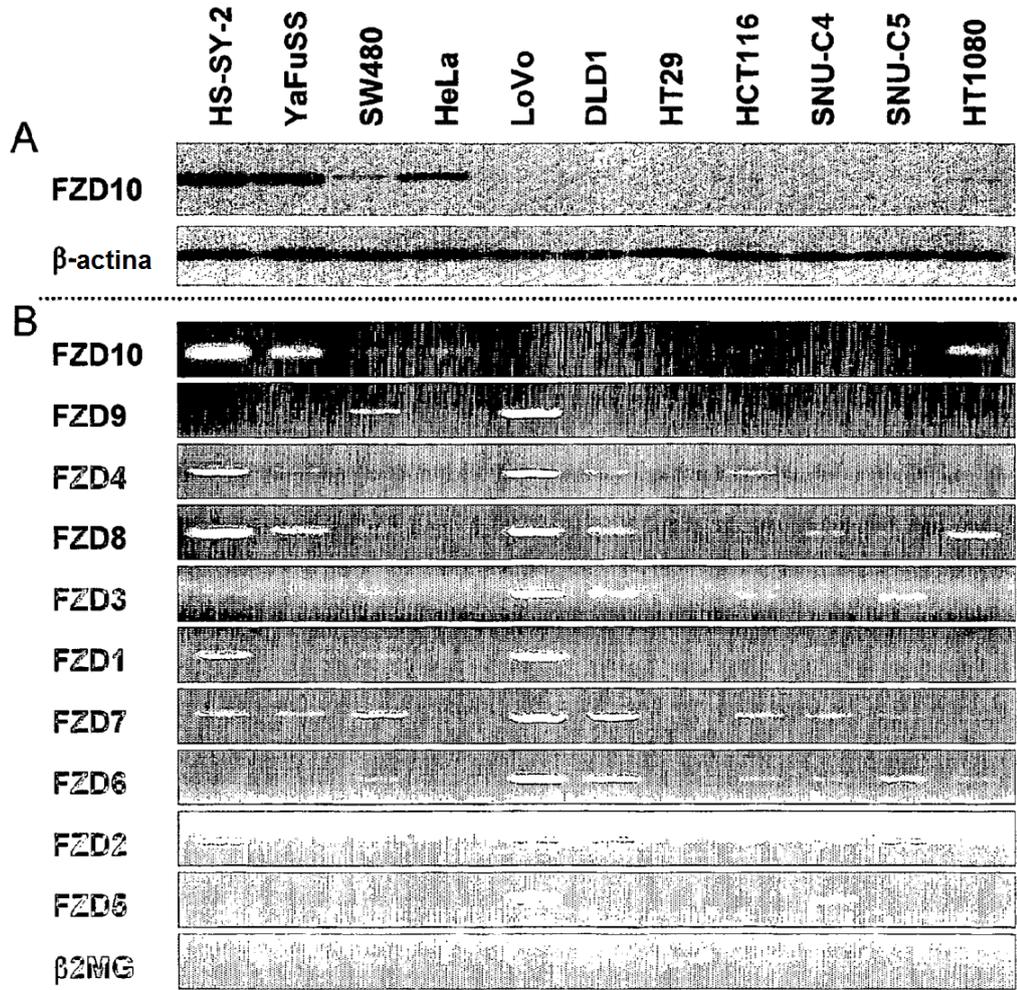


Fig. 3

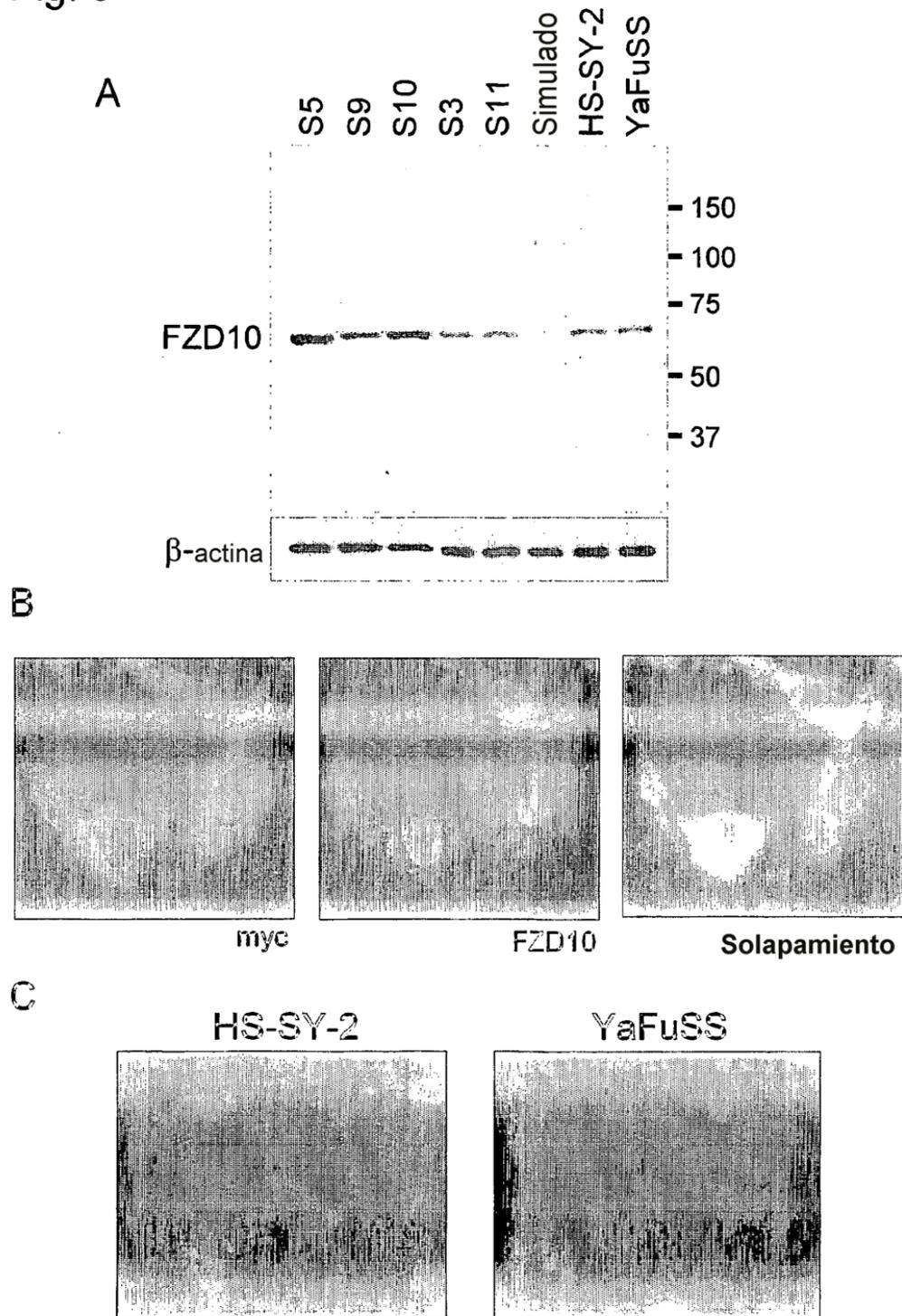


Fig. 4

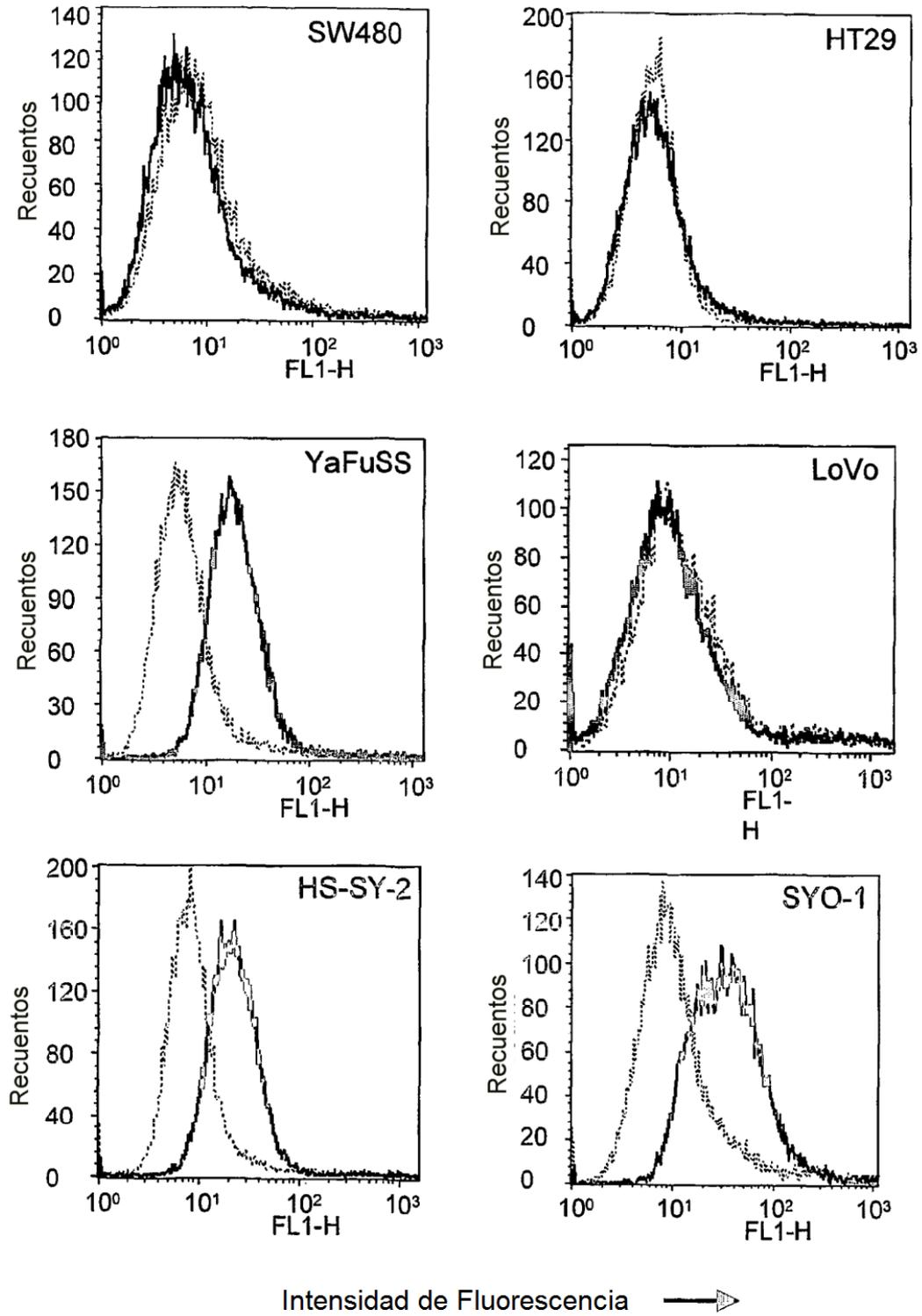
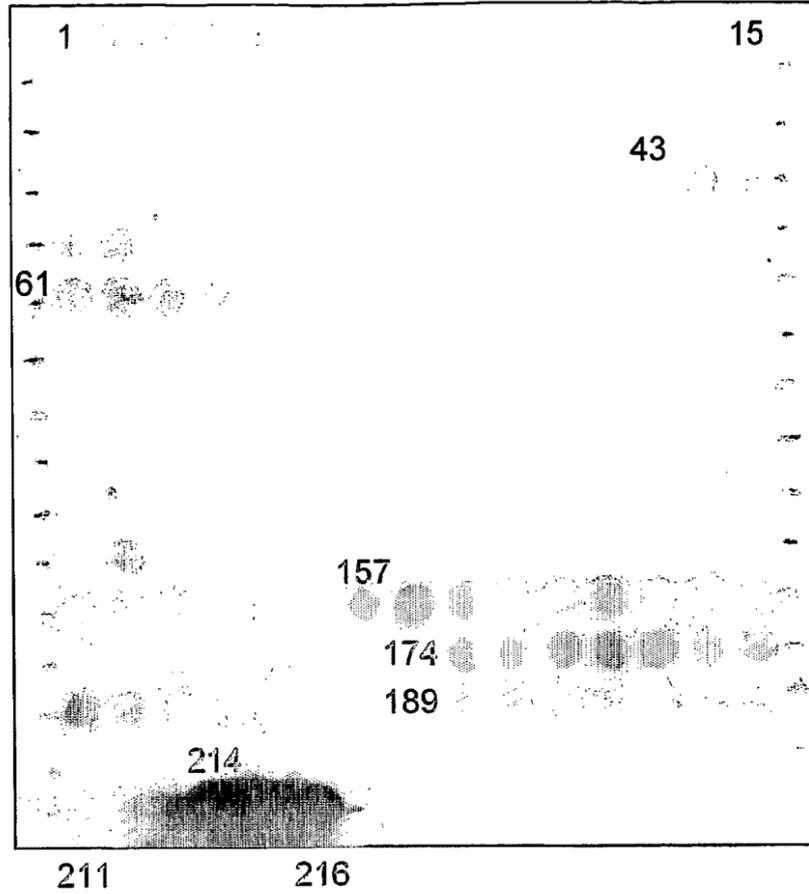


Fig. 5



214	GVDVYWSREDKR
157	EPTRGSGLFPPLFRPQ
174	PHSAQEHPLKDGGPGRGG
43	KDIGYNMTRMPNLM
61	QREAAIQLHEFA
189	RGGCDNPGKFHHVE

Fig. 6

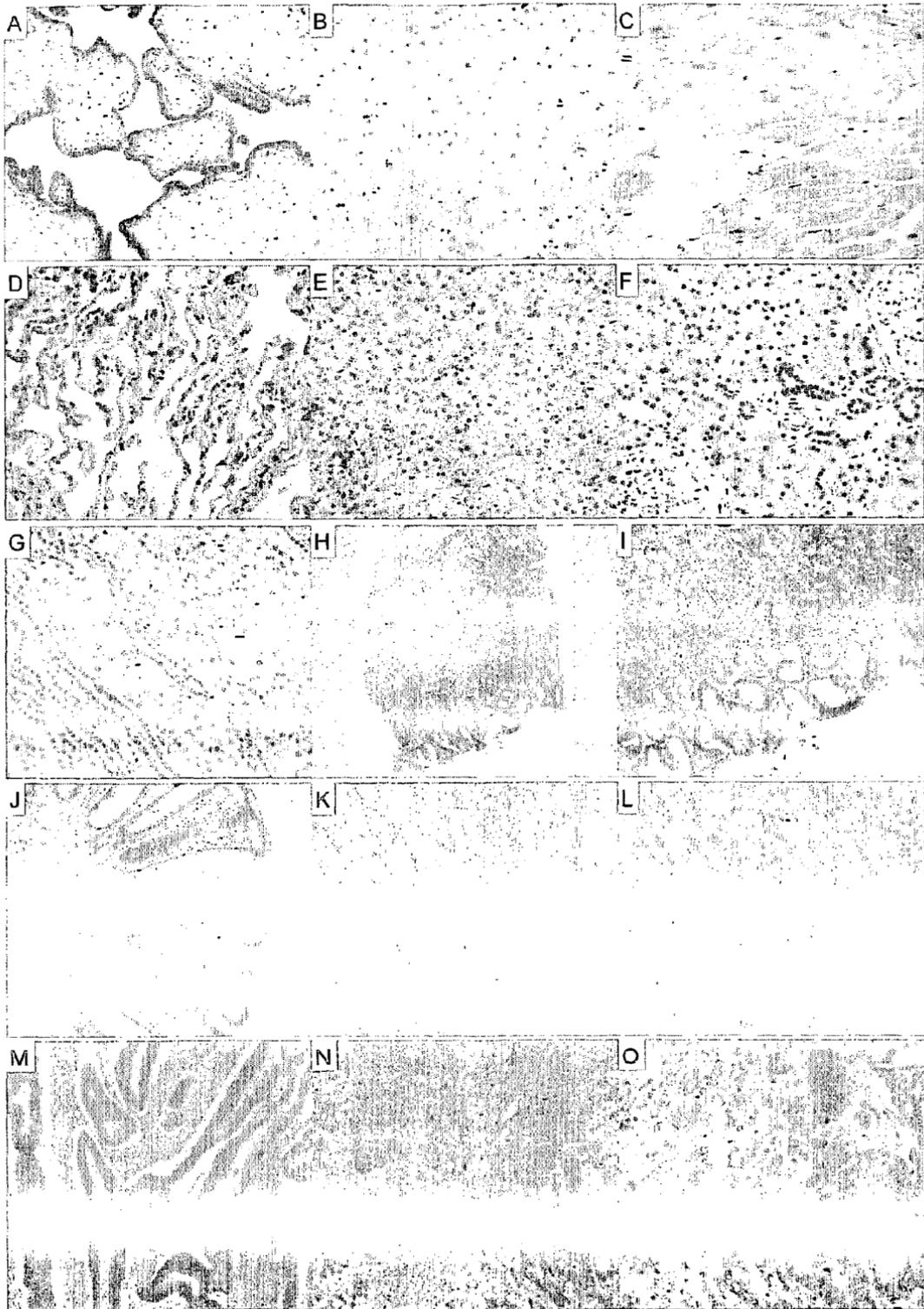


Fig. 7

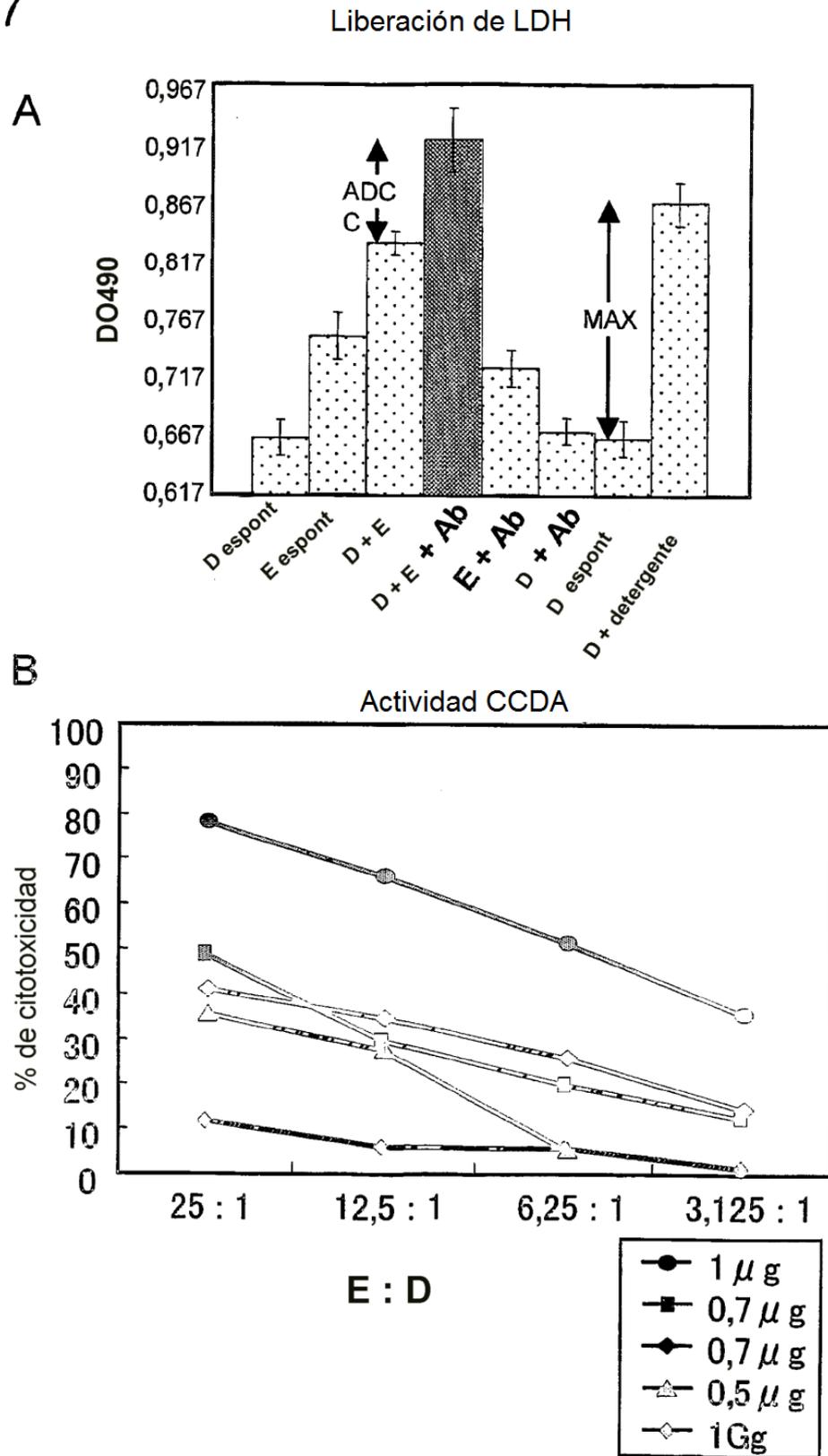


Fig. 8

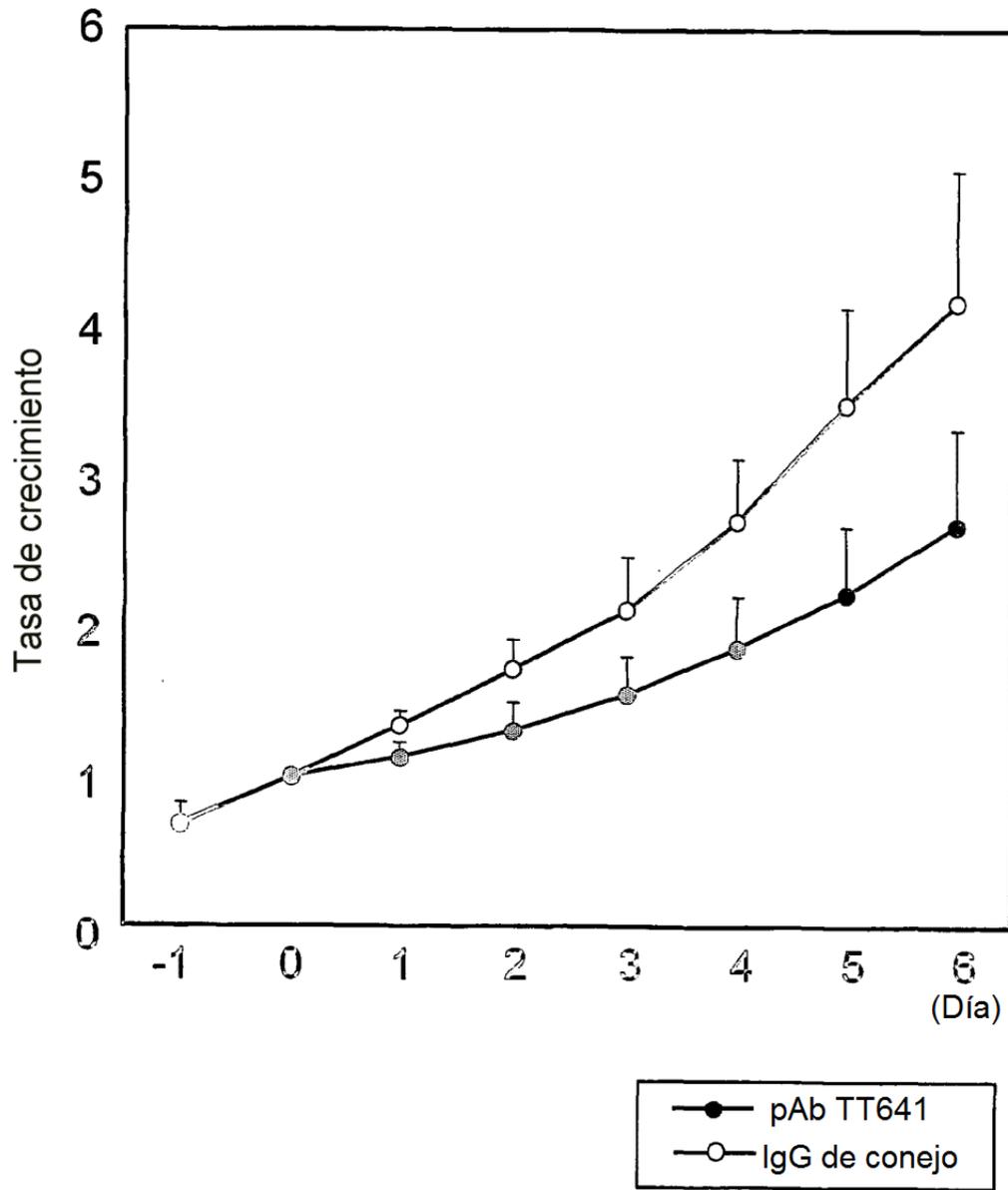


Fig. 9

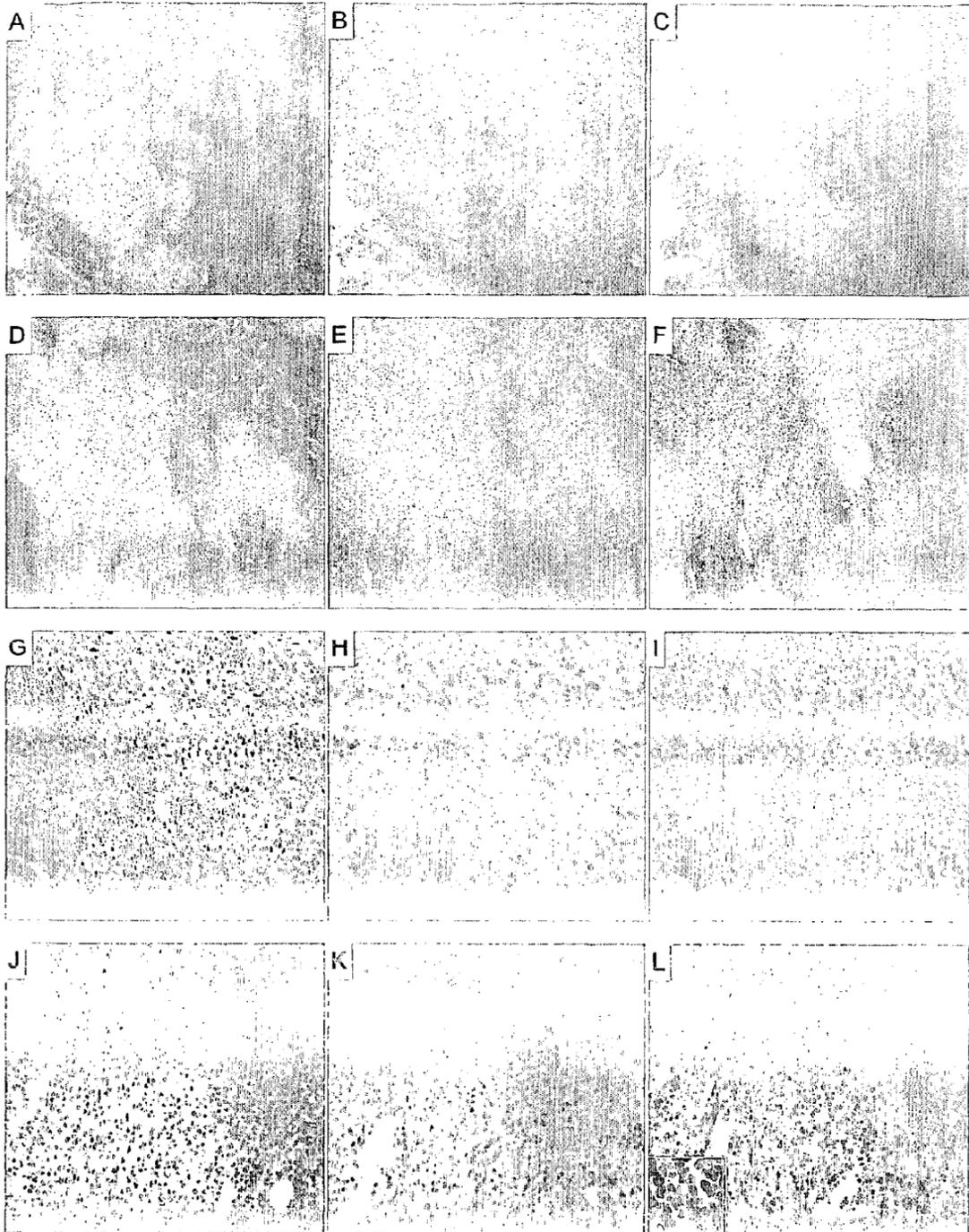


Fig. 10

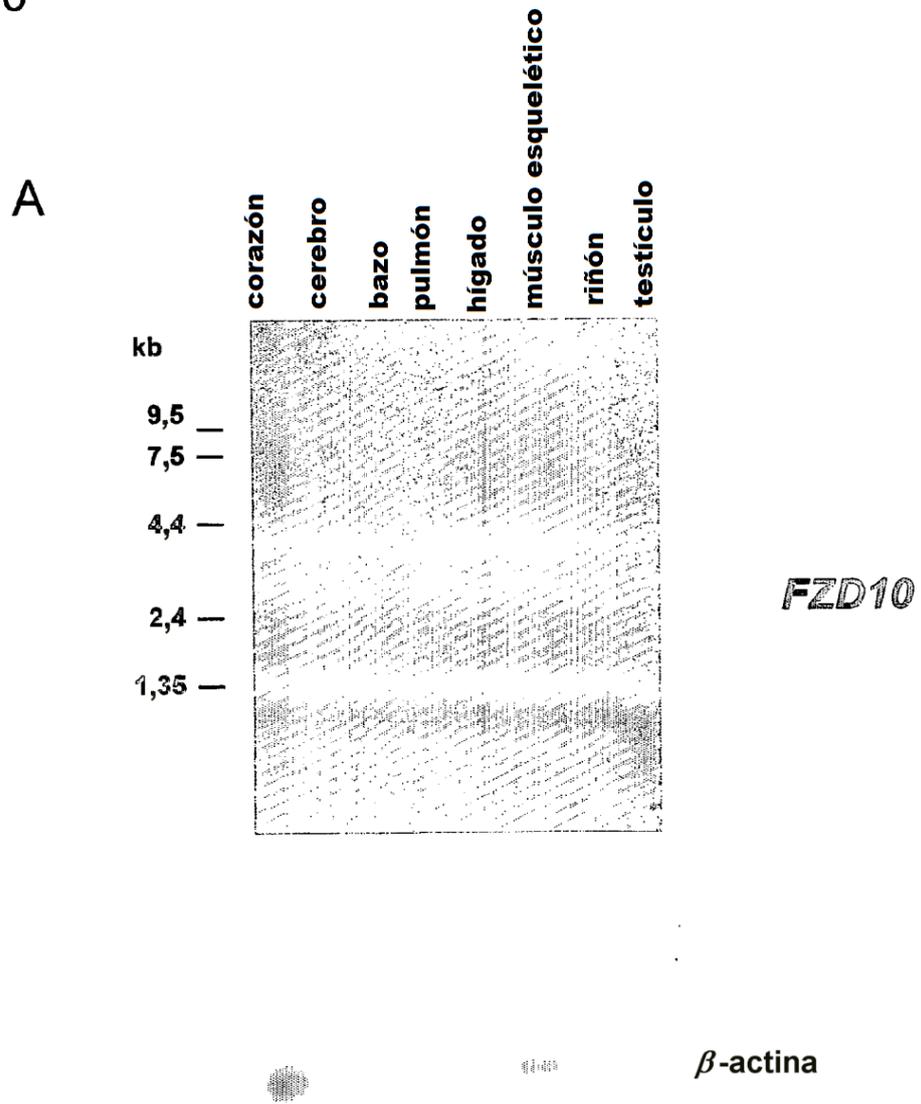


Fig. 10

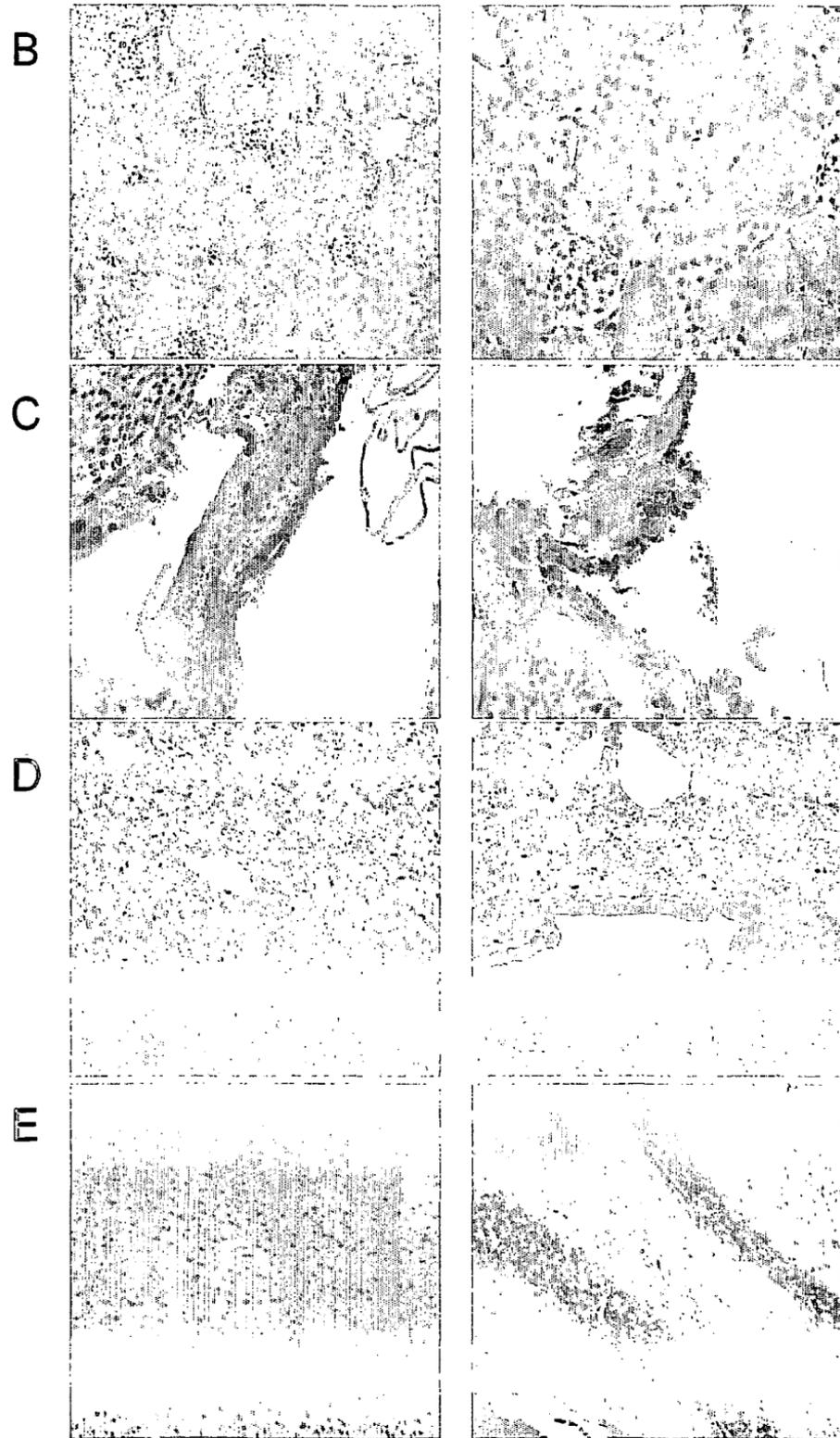


Fig. 11A

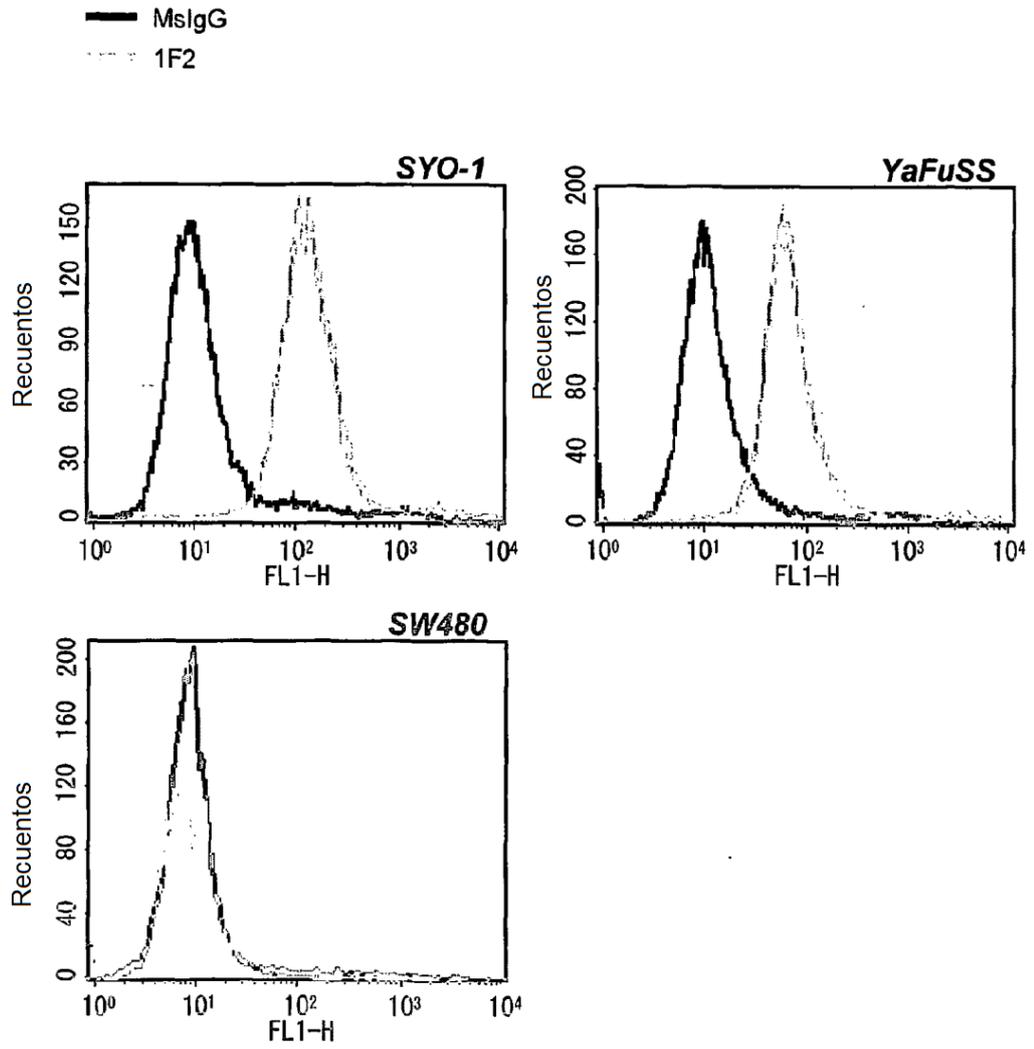


Fig. 11B

— MslgG
- - - 1F4

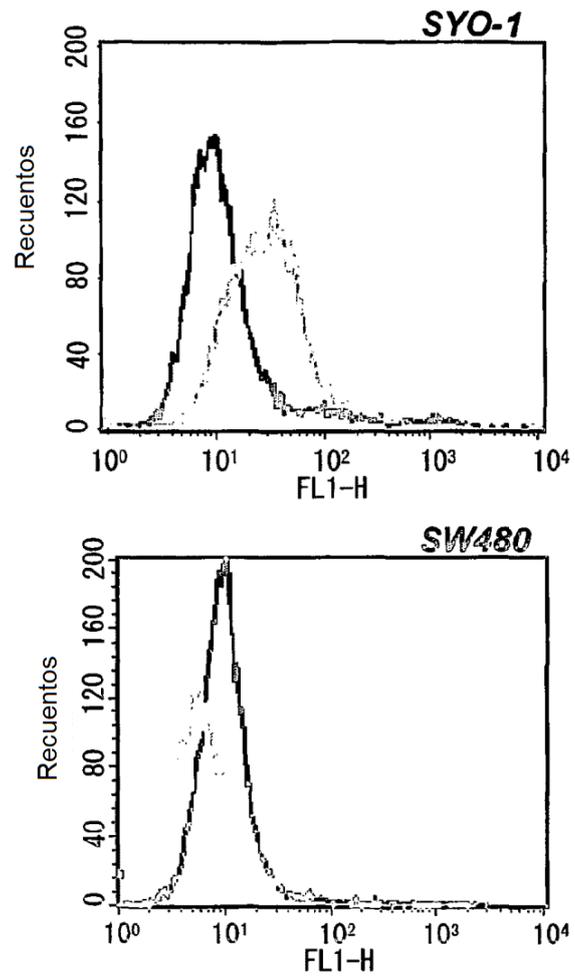


Fig. 11C

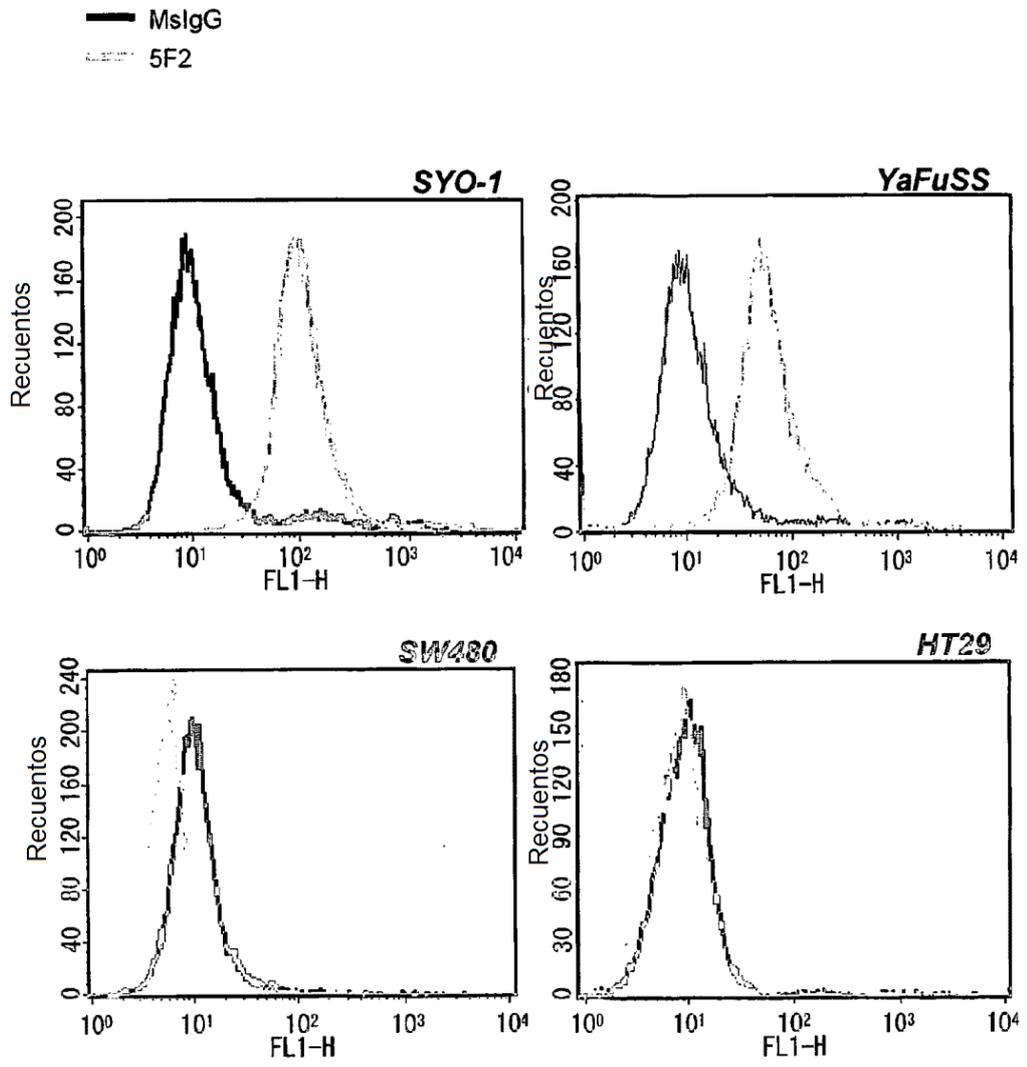


Fig. 11D

— MslgG
--- 5H4

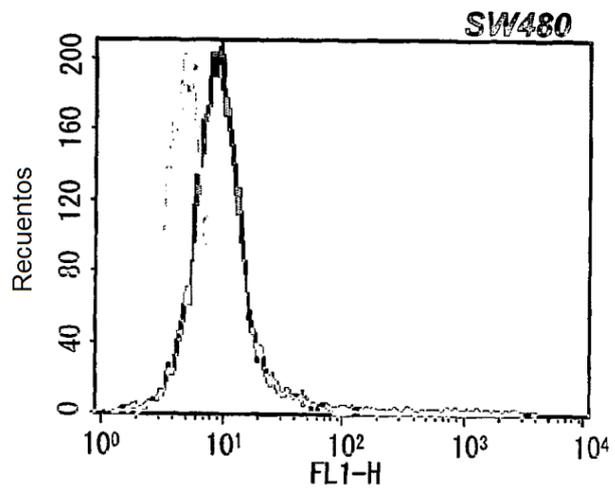
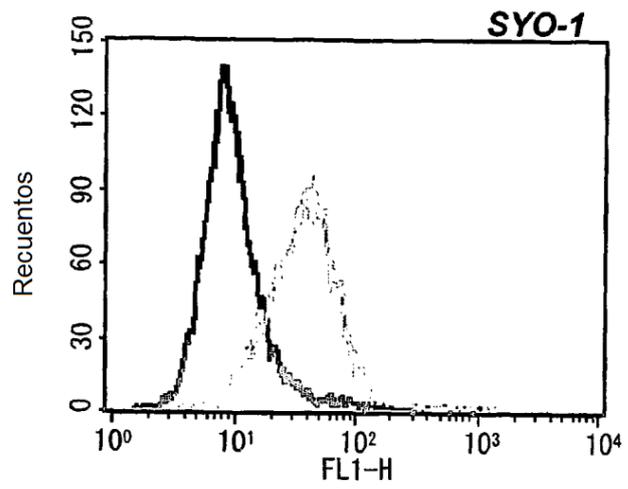


Fig. 11E

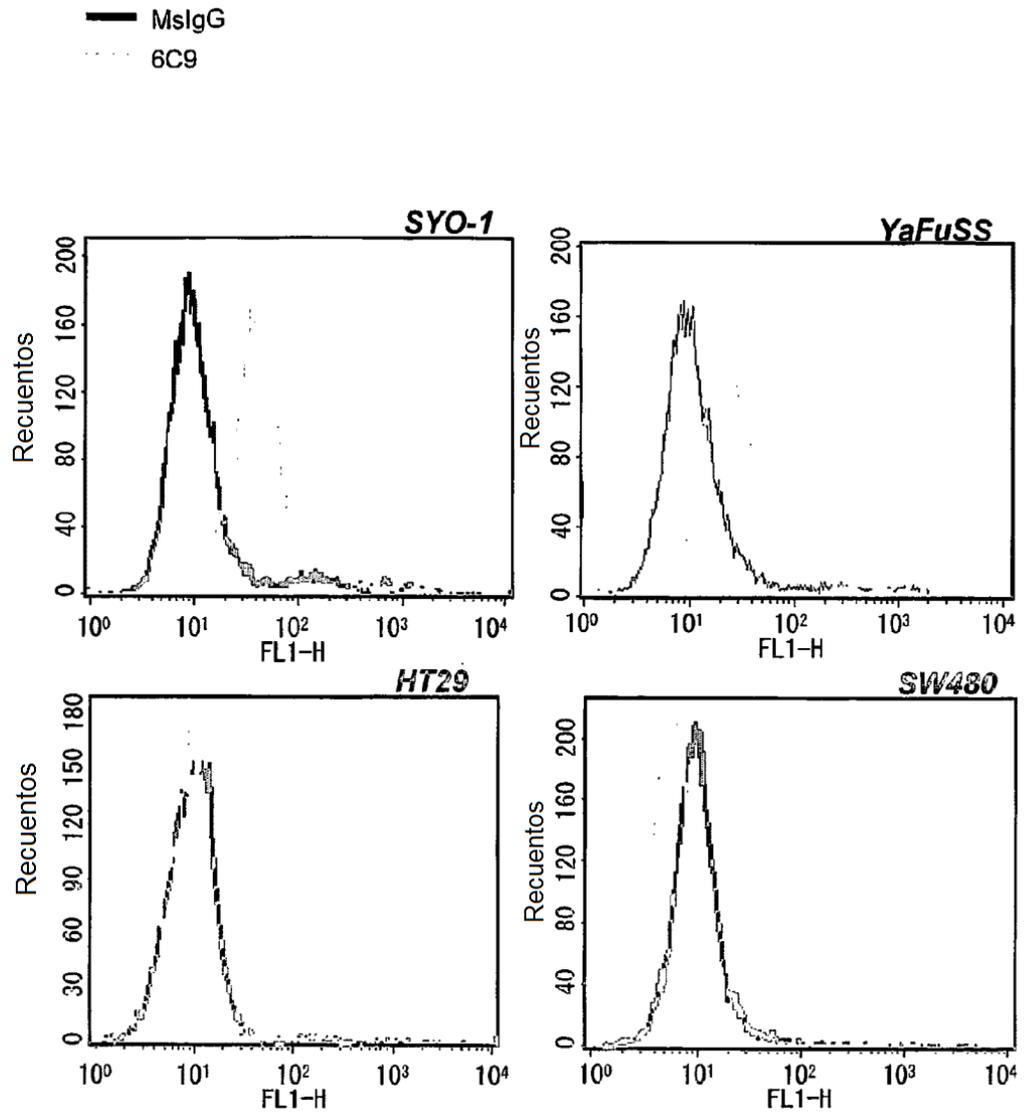
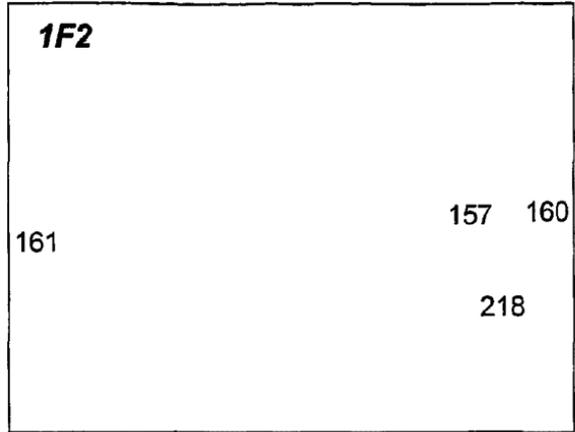
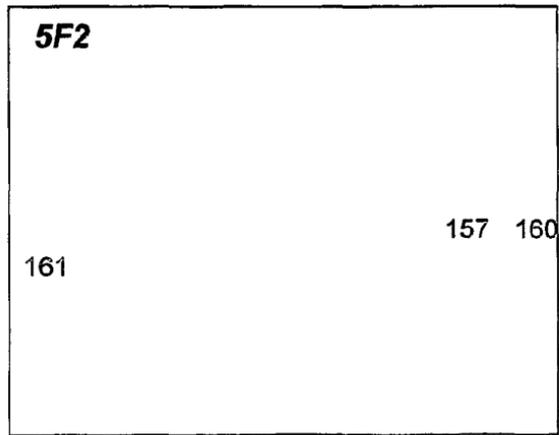


Fig. 12

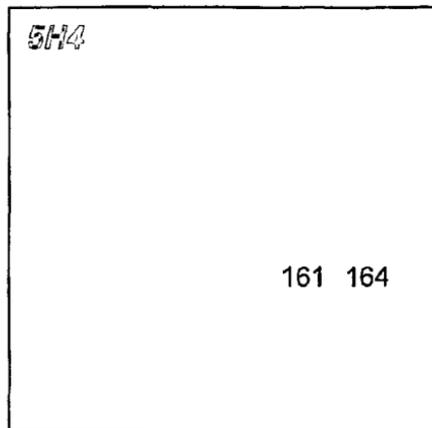
157-170 : EPTRGSGLPPLFR



157-170 : EPTRGSGLPPLFR



161-173 : GSGLFPPLFRPQR



156-169 : DEPTRGSGLPPLF

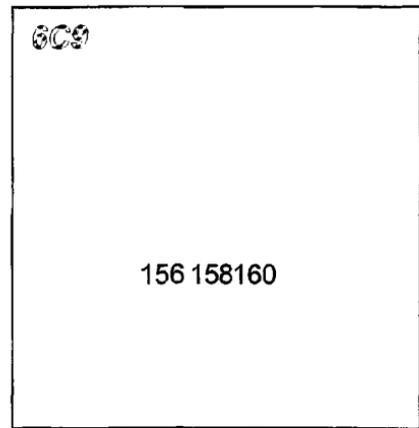


Fig. 13

