

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 539**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **10180748 .5**

96 Fecha de presentación: **08.11.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **2301576**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.03.2011**

54 Título: **Utilización terapéutica de anticuerpos anti-CS1**

30 Prioridad:

29.03.2004 US 557621 P

29.03.2004 US 557620 P

29.03.2004 US 557622 P

07.05.2004 US 842011

05.11.2004 US 982357

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

26.12.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

26.12.2012

73 Titular/es:

ABBOTT BIOTHERAPEUTICS CORP. (100.0%)

1500 Seaport Boulevard

Redwood City CA 94063, US

72 Inventor/es:

WILLIAMS, MARNA;

TSO, J. YUN;

LANDOLFI, NICOLAS F. y

LIU, GAO

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 393 539 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

Utilización terapéutica de anticuerpos anti-CS1.

- 5 La descripción se refiere al campo de los antagonistas y anticuerpos en el tratamiento de enfermedades, incluidas las enfermedades autoinmunitarias relacionadas y el cáncer. La descripción se refiere además a procedimientos para la detección, identificación y modulación de estas enfermedades.

Antecedentes de la invención

- 10 El aumento de expresión de la inmunoglobulina es una característica de muchas enfermedades. Una gran cantidad de secreción de inmunoglobulina produce una variedad de enfermedades, incluyendo el síndrome de hiperviscosidad, un trastorno debilitante que produce fatiga, dolores de cabeza, dificultad de respiración, confusión mental, dolor torácico, alteración e insuficiencia renal, problemas de visión y el fenómeno de Raynaud (mala circulación sanguínea, especialmente dedos de las manos, de los pies, nariz y orejas), enfermedad de las crioaglutininas, crioglobulinemia mixta, hipergammaglobulinemia, síndrome de Sjogren, liquen mixedematoso y enfermedad de Gaucher son ejemplos de enfermedades asociadas al aumento de expresión de inmunoglobulinas.

- 20 El aumento de expresión de la inmunoglobulina dirigida a autoproteínas es una característica de las enfermedades autoinmunitarias. Enfermedad autoinmunitaria es una insuficiencia del sistema inmunitario para reconocer auto-antígenos como propios. En las enfermedades autoinmunitarias, el sistema inmunitario por error se ataca a sí mismo, dirigiéndose a las células, tejidos y órganos, dando como resultando eventualmente la destrucción de los sistemas fisiológicos. La autoinmunidad y las enfermedades autoinmunitarias son de origen multifactorial, con predisposición genética, factores del hospedador (por ejemplo, debilidad de los controles inmunorreguladores, defectos en linfocitos T supresores o estimulación policlonal de linfocitos B resistentes a los controles), los factores ambientales y los mecanismos dirigidos al antígeno que están implicados en el desarrollo de la autoinmunidad y la producción de auto-anticuerpos contra los antígenos propios.

- 30 Trastornos gastrointestinales y lupus eritematoso diseminado (LED) son dos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias. La enfermedad inflamatoria intestinal (EII), un subgrupo de trastornos gastrointestinales, es un grupo de trastornos incurables que afectan a aproximadamente 4 millones de personas en todo el mundo. La etiología de la enfermedad inflamatoria intestinal recurrente es actualmente desconocida. Las teorías incluyen una destrucción autoinmunitaria en la que intervienen las células gastrointestinales, incluyendo los linfocitos. La agregación anormal homotípica en modelos de enfermedades hereditarias inflamatorias intestinales se ha demostrado anteriormente, y las mutaciones en NOD2, un gen implicado en trastornos autoinmunitarios, se ha demostrado que predisponen a los pacientes a la enfermedad de Crohn. Ni, J. *et al.*, Immunological abnormality in C3H/HeJ mice with heritable inflammatory bowel disease, *Cell Immunol.* 169:7-15 (1996); Ogura, Y. *et al.*, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's Disease, *Nature* 411: 603-606 (2001).

- 40 Las EII muy a menudo afectan al intestino delgado y colon, pero pueden afectar a cualquier parte del aparato digestivo. Hay más de 1 millón de personas diagnosticadas con EII sólo en los Estados Unidos, con más de 10.000 nuevos casos diagnosticados anualmente. Debido al efecto drástico en la calidad de vida de los pacientes con EII, decenas de miles de horas perdidas son reclamados cada año, lo que equivale a 1 billón de dólares en días de trabajo perdidos al año.

- 45 La EII produce una serie de síntomas gastrointestinales y extraintestinales, incluidas la diarrea, la hemorragia rectal, dolor abdominal, la pérdida de peso, trastornos cutáneos y oculares y retraso en el crecimiento y la maduración sexual en los niños. Dos tipos de EII son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, que comparten síntomas y manifestaciones fisiológicas similares, pero difieren en la manera en que afectan el aparato digestivo. La colitis ulcerosa se caracteriza por la inflamación ulcerosa de la totalidad o parte de la mucosa del colon, con más frecuencia incluyendo el recto. Sus síntomas incluyen la hemorragia rectal y tenesmo rectal, tenesmo y diarrea. La colitis ulcerosa viene acompañada por complicaciones graves de corta y larga duración. Las complicaciones de corta duración más graves son la colitis fulminante, el megacolon tóxico y la perforación. Graves complicaciones a largo plazo incluyen la osteoporosis y el cáncer colorrectal.

- 50 La enfermedad de Crohn es una inflamación crónica transparietal que puede afectar a cualquier parte del aparato digestivo, desde la boca hasta el ano. La enfermedad de Crohn es discontinua, con las áreas no afectadas intercaladas entre una o más áreas implicadas. Al final de la enfermedad, la mucosa desarrolla un aspecto en empedrado, que procede de profundas ulceraciones longitudinales entrelazadas con intervención de la mucosa normal.

- 55 La mayoría de los pacientes con enfermedad de Crohn presentan síntomas de dolor y sensibilidad abdominal, diarrea crónica o nocturna, hemorragia rectal, pérdida de peso y fiebre. Enfermedad de Crohn evoluciona con el tiempo desde una enfermedad inflamatoria principalmente a uno de dos modelos clínicos: estenosis (obstructiva) o penetrante (fistulizante). En la forma de estenosis, la inflamación transparietal produce proliferación fibromuscular en la pared intestinal, seguido de estrechamiento luminal. Los síntomas de obstrucción se vuelven normales a medida

que la EC progresa. En la forma penetrante, las fístulas forman como túneles de inflamación a través de la pared intestinal y rompen la superficie serosa, fistulizando en los tejidos adyacentes e incluso a través de la piel.

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn generalmente se diagnostican utilizando criterios clínicos, endoscópicos e histológicos. Sin embargo, hasta ahora las técnicas de diagnóstico tradicionales han demostrado que ningún resultado por separado es absolutamente diagnóstico de una u otra enfermedad. Además, aproximadamente el 20% de los pacientes tienen un cuadro clínico que cae entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Los pacientes que se ajustan a este perfil se dice que tienen colitis indeterminada.

Los síntomas de la EI puede afectar en gran medida al bienestar, a la calidad de vida y la capacidad de funcionar de un paciente. Los períodos inflamatorios son prolongados y frecuentes, y dependiendo de la gravedad, paralizante de vida. Debido a que la EI es crónica y suele comenzar antes de los 30 años de edad, los pacientes generalmente requieren tratamiento de por vida. La aclaración de una función para nuevas proteínas y compuestos en estados de enfermedad para la identificación de potenciales dianas y marcadores de diagnóstico es valiosa para mejorar el tratamiento actual de los pacientes de enfermedades inflamatorias intestinales.

El LED se caracteriza por la producción de auto-anticuerpos para una variedad de moléculas ubicuas, que pueden tener consecuencias patógenas incluyendo daño a numerosos órganos y tejidos, incluyendo la piel, riñones, cerebro y corazón. Los tratamientos actuales aprobados para LED implican inmunosupresión no específica y control de los síntomas mediante esteroides, fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores y fármacos contra la malaria. Sin embargo, estos métodos de tratamiento dan como resultado riesgos de toxicidad renal y mortalidad precoz. Por lo tanto, es deseable desarrollar un nuevo método que interfiera específicamente con la activación de linfocitos y la producción de auto-anticuerpos.

Otras enfermedades autoinmunitarias en las que el aumento de expresión de inmunoglobulina y/o linfocitos B desempeña una función significativa incluyen la trombocitopenia idiopática, la artritis reumatoide (AR), la anemia hemolítica autoinmunitaria y la miastenia grave. Las pruebas de la función de las linfocitos B y/o del aumento de inmunoglobulina procede de estudios con pacientes tratados con esteroides, agentes inmunosupresores y/o anticuerpos anti-CD20 (y afectan a las linfocitos B). La mejora en los síntomas de estas enfermedades se correlaciona con una disminución de las linfocitos B y/o de inmunoglobulina sérica, lo que subraya el papel fundamental que los linfocitos B desempeñan en varias enfermedades autoinmunitarias.

El aumento de expresión de inmunoglobulina también se puede ver en las enfermedades malignas. Al igual que los trastornos autoinmunitarios, la etiología del cáncer es asimismo de origen multifactorial. Cáncer, que es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos, se ha relacionado con mutaciones en el ADN que causan el crecimiento incontrolado de las células. La predisposición genética desempeña una función importante en el desarrollo de muchos tipos de cáncer, en combinación con factores ambientales, tales como el tabaquismo y la mutagenia química.

El cáncer puede ocurrir en cualquier tejido u órgano del cuerpo. Neoplasias de células plasmáticas, incluyendo el mieloma múltiple, el mieloma "solitario" de huesos, el plasmocitoma extramedular, la leucemia de células plasmáticas, la macroglobulinemia (incluyendo macroglobulinemia de Waldenstrom), enfermedad de cadena pesada, la amiloidosis primaria, la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI) se asocian con el aumento de expresión de inmunoglobulinas. Leucemia linfocítica crónica (LLC), neoplasia de células no plasmáticas, también se asocia a altos niveles de expresión de la inmunoglobulina.

Los mielomas son tumores de células plasmáticas procedentes de un solo clon, que suelen originarse en el tejido linfóide secundario y luego migra al interior y reside en el tejido de la médula ósea. Los mielomas comúnmente afectan a la médula ósea y las estructuras óseas adyacentes, con síntomas primarios de dolor óseo y fracturas patológicas o lesiones (lesiones óseas osteolíticas), hemorragia anormal, anemia y aumento de la sensibilidad a las infecciones. Las etapas avanzadas de la enfermedad incluyen insuficiencia renal, deformidades del esqueleto, la compactación de la médula espinal y la hipercalcemia. El mieloma afecta a las células óseas provocando la resorción osteoclástica del hueso, por lo tanto, diezmando la estructura ósea y aumentando la concentración de calcio en plasma. La etiología de mielomas es actualmente desconocida. Se han supuesto relación con la radiación, las mutaciones en oncogenes, causas familiares y la expresión anormal de IL6.

Los mielomas múltiples son tumores de células plasmáticas con múltiples orígenes. Los mielomas múltiples totalizan casi el 10% de todas las neoplasias de células plasmáticas, y son el cáncer de hueso más frecuente en los adultos, con una tasa de incidencia anual de 3 a 4 casos por cada 100.000 personas. En los Estados Unidos, mielomas múltiples son la segunda neoplasia hematológica maligna más frecuente después del linfoma no hodgkiniano, con aproximadamente 50.000 casos sólo en los Estados Unidos, y aproximadamente 13.500 nuevos casos declarados cada año. La perspectiva de pronóstico de los pacientes diagnosticados con mieloma múltiple es desalentadora, con sólo varios meses a un año para los pacientes con formas avanzadas de la enfermedad.

Las regiones de tratamiento tradicionales para mieloma y mieloma múltiples (en adelante denominado "mieloma") consisten en quimioterapia, terapia de radiación y cirugía. Además, el trasplante de médula ósea se recomienda

para pacientes que de otra manera tienen buena salud. La tasa de curación de los pacientes se aproxima a 30%, y es el único procedimiento conocido que pueda curar mielomas. Sin embargo, para las personas que son mayores o que no pueden tolerar procedimientos de trasplante de médula ósea, la quimioterapia es el más apropiado.

Los actuales procedimientos de diagnóstico incluyen rayos X, aspiración de médula ósea, análisis de sangre y de orina (para detectar la presencia de la proteína de Bence Jones), y el ensayo de velocidad de sedimentación eritrocitos. Los posibles marcadores de la superficie celular en las células plasmáticas mielomatosas también se han identificado, incluyendo CD38, CD9, CD10, HLA-DR y CD20. Ruiz-Augelles G.J. y San Miguel J.F., *Cell Surface Markers in Multiple Myeloma*, *Mayo Clin. Proc.* 69:684-90 (1994). Otros marcadores de linaje no de linfocitos B incluyen CD2, CD4, CD13, CD14, CD15, CD23, CD24, CD25, CD33, CD39, CDw40, CD41, CD45R, CD54, CD56 y CD71, así como antígenos no agrupados, R1-3, PCA-1, PCA-2, PC1, 62B1, 8A, 8F6 y MM4). Ruiz-Argüelles, más arriba; Leo R., *et al.*, Multiparameter analysis of normal and malignant human plasma cells, *Ann. Hematol.* 64:132-9 (1992). Además, la aparición de anticuerpos anormales, conocidos como proteína M, es un indicador del mieloma múltiple. El aumento de la producción de proteína M se ha relacionado con el síndrome de hiperviscosidad en mielomas múltiples, causando efectos secundarios debilitantes, como fatiga, dolores de cabeza, dificultad de respiración, confusión mental, dolor de pecho, alteración e insuficiencia renal, problemas de visión y el fenómeno de Raynaud (mala circulación sanguínea, especialmente en los dedos de las manos, de los pies, nariz y orejas). La crioglobulinemia se produce cuando la proteína M en la sangre forma partículas en condiciones de frío. Estas partículas pueden obstruir pequeños vasos sanguíneos y causar dolor y entumecimiento en los dedos de los pies, dedos de las manos y otras extremidades durante el tiempo frío. También se han estudiado los indicadores de pronóstico, tales como eliminaciones cromosómicas, concentraciones elevadas de beta-2-microglobulina, niveles de creatinina en suero e isotipado de IgA. Tricot G., *et al.*, Poor prognosis in Multiple Myeloma, *Blood* 86:4250-2 (1995).

CS1 (SLAMF7, 19A, número de registro en GenBank NM_021181.3, ref. Boles y Mathew (2001) 52:302-307 *Immunogenetics*; Bouchon *et al.*, (2001) *J. Immunol.* 167:5517-5521; Murphy *et al.*, (2002) *Biochem. J.* 361:431-436) es un miembro del subconjunto CD2 de la superfamilia de las inmunoglobulinas. Las moléculas de la familia CD2 están involucradas en una amplia gama de funciones inmunomoduladoras, tales como la coactivación, la diferenciación de proliferación y la adhesión de los linfocitos, así como la secreción de inmunoglobulinas, la producción de citocinas, y la citotoxicidad de células NK. Varios miembros de la familia CD2, tales como CD2, CD58 y CD150, desempeñan una función o se han propuesto para desempeñar una función en una serie de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, tales como la psoriasis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.

CS1 (también conocido como CRACC, 19A, APEX-1, y FOAP12) fue aislado y clonado por Boles, K. *et al.* (Véase *Immunogenetics* 52: 302-307 (2001)). Se ha informado de que CS1 desempeña una función en la citotoxicidad en la que intervienen las células NK y en la adhesión de los linfocitos (Bouchon, A., *et al.*, *J. of Immuno.* 5517-5521 (2001); Murphy, J. *et al.*, *Biochem. J.* 361: 431-436 (2002)).

La publicación PCT WO 01/46260 da a conocer un anticuerpo monoclonal contra APEX-1 y su utilización para la detección del dominio extracelular de APEX-1 recombinante producido. La publicación de patente US 2003/0113332A1 da a conocer anticuerpos monoclonales contra los péptidos de receptores de la superficie de células destructoras naturales que se unen a CS1 y conducen a la activación de las células NK. Sin embargo, los anticuerpos capaces de inhibir la producción de inmunoglobulinas por las linfocitos B y/o la proliferación y/o el desarrollo de mielomas no se han desarrollado ni dado a conocer en las publicaciones mencionadas anteriormente. Además, las pruebas de la sobreexpresión de CS-1 en la enfermedad autoinmunitaria o cáncer no se han desarrollado o dado a conocer en las publicaciones mencionadas anteriormente.

La aclaración de una función para nuevas proteínas y compuestos en estados de enfermedades para la identificación de dianas potenciales y marcadores de diagnóstico es deseable para mejorar el tratamiento actual de pacientes autoinmunes y de cáncer, incluyendo los pacientes afectados por EII, LED, AR y mieloma. Por consiguiente, en la presente memoria se proporcionan dianas moleculares para el tratamiento y el diagnóstico de estas enfermedades, en particular CS1. Además, en la presente memoria se proporcionan antagonistas que se unen a CS1 y le neutralizan, incluyendo los anticuerpos neutralizantes tales como anticuerpos anti-CS1.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un anticuerpo monoclonal anti-CS1 o un fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su administración en combinación con Velcade para el tratamiento del mieloma múltiple, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 se une a una proteína codificada por SEC. ID. nº 1, inhibe la secreción de inmunoglobulina y compite por unirse a dicha proteína con un anticuerpo de control, en el que el anticuerpo de control comprende una región VH que comprende la SEC. ID. nº 5 y una región VL que comprende la SEC. ID. nº 6.

La presente invención proporciona además la utilización de (a) un anticuerpo monoclonal anti-CS1 o un fragmento que se une al antígeno anti-CS1 y (b) Velcade para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del mieloma múltiple, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 se une a una proteína codificada por la SEC. ID. nº 1, inhibe la secreción de inmunoglobulina y compite por

la unión a dicha proteína con un anticuerpo de control, en el que el anticuerpo de control comprende una región VH que comprende la SEC. ID. nº 5 y una región VL que comprende la SEC. ID. nº 6.

La presente descripción proporciona un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno que se une a un epítipo de CS1 humano reconocido por Luc 90. Luc 90 y otros anticuerpos que comparten el mismo epítipo, incluyendo Luc 34, Luc 69 y Luc X, son capaces de inhibir la secreción de inmunoglobulinas y la destrucción de células que expresan CS1.

Un anticuerpo o un fragmento que se une utilizado en la presente invención se une a un epítipo de CS1 humano reconocido por Luc 63. Luc 63 y otros anticuerpos que comparten el mismo epítipo, incluyendo Luc 4, Luc 12, Luc 23, Luc 29, Luc 32 y Luc 37, son capaces de inhibir la secreción de inmunoglobulinas y la destrucción de células que expresan CS1.

Un anticuerpo o un fragmento que se une al antígeno utilizado en la presente invención desencadena efectos citotóxicos en las células que expresan CS1 o aumenta la citotoxicidad en la que intervienen inmunocitos, incluyendo la citotoxicidad en la que interviene CCDA de las células que expresan CS1.

La presente descripción proporciona además un procedimiento para destruir células que expresan CS1 comprende poner en contacto las células con una cantidad eficaz de anticuerpo anti-CS1. Las células que expresan CS1 incluyen células cancerosas plasmáticas de, por ejemplo, mieloma múltiple, y células cancerosas no plasmáticas, por ejemplo, de leucemia linfocítica crónica. Las células que expresan CS1 incluyen además leucocitos tales como las linfocitos B activados o linfocitos T, y leucocitos de pacientes que padecen LED y artritis reumatoide.

La presente descripción proporciona además un procedimiento para tratar un individuo que padece cáncer de células plasmáticas, LED, artritis reumatoide o enfermedad inflamatoria intestinal.

Breve descripción de los dibujos

Figuras

La figura 1A muestra la inhibición de la producción *in vivo* de IgG humana en el modelo de ratón SCID-HuCMSP por anticuerpos anti-CS1 monoclonales.

La figura 1B muestra una comparación de la inhibición *in vivo* de la producción de IgG humana en el modelo de ratón SCID-HuCMSP por de anticuerpos anti-CS1 monoclonales Luc 90 y 63.

La figura 1C muestra un resumen de la inhibición *in vivo* de la producción de IgG humana en el modelo de ratón SCID-HuCMSP por anti-CS1 de anticuerpos monoclonales.

La figura 2 muestra disminución de los volúmenes tumorales en modelos de ratón con xenoinjerto de mieloma múltiple tratados con anticuerpos anti-CS1 Luc 90 y Luc 63 frente a anticuerpos de control de isotipo.

La figura 3 muestra el efecto de anticuerpos anti-CS1 Luc63 y Luc63 humanizados sobre el crecimiento del tumor OPM-2 *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que no hay ninguna expresión significativa de la proteína CS1 detectada en las plaquetas, glóbulos rojos, células endoteliales (HuVEC), células de riñón, células de las vías respiratorias bronquiales, células pequeñas de las vías respiratorias, células de próstata, células del hígado o células de mama. Expresión CS1 es linfoidea específica, y se detecta en las células de pacientes, incluyendo las células plasmáticas de pacientes con mieloma múltiple y con leucemia de células plasmáticas. La expresión se detecta solamente en células plasmáticas y no es detectable a niveles significativos en otros tipos de células procedentes de muestras de médula ósea. Por consiguiente, la presente invención ha demostrado la viabilidad de utilizar anticuerpos anti-CS1 como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer, incluyendo pero sin limitarse a neoplasias de células plasmáticas, incluyendo mieloma, mieloma múltiple, mieloma "solitario" de hueso, plasmacitoma extramedular, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia (incluyendo macroglobulinemia de Waldenstrom), enfermedad de cadenas pesadas, amiloidosis primaria, la gammapatía monoclonal de significado incierto (GMSI). Además, los neoplasmas de células plasmáticas asociados al aumento de expresión de inmunoglobulina, incluyendo la leucemia linfocítica crónica (LLC), también se beneficiarán de la terapia con anti-CS1.

Además, los estudios anteriores no han revelado la expresión de la proteína CS1 en linfocitos B de sangre periférica activados con PWM *in vitro* (mitógeno de hierba carmín), los subconjuntos de memoria/efector frente a linfocitos B y linfocitos T naturales de la sangre periférica, o monocitos CD14⁺/macrófagos de la sangre periférica. Los estudios anteriores no han dado a conocer tampoco la función de CS1 en la producción de inmunoglobulinas. Como

resultado, la correlación entre CS1 y las enfermedades autoinmunitarias no se ha demostrado previamente. La presente invención también está regulada en los linfocitos B activados de la sangre periférica, el subconjunto de células responsables de la producción de auto-anticuerpos y se cree que desempeñan una función significativa en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Además, la presente descripción ha dado a conocer que la expresión del ARN de CS1 en linfocitos de sangre periférica B de pacientes con LED aumenta en comparación con las linfocitos B de adultos sanos de la misma edad, así como en pacientes afectados por EII. La presente invención da a conocer que el CS-1 se expresa en células plasmáticas infiltrantes en la artritis reumatoide (AR) sinovial. La presente descripción también ha dado a conocer que CS1 está implicado en la producción de anticuerpos y que los anticuerpos contra CS1 disminuyen IgM e IgG segregadas por los linfocitos B procedentes de adultos sanos y pacientes con lupus. Posteriormente, los datos de la presente descripción sugieren que CS1 desempeña una función importante en la comprobación de enfermedades autoinmunitarias, especialmente LES, EII y AR. Otras enfermedades asociadas a un aumento de inmunoglobulina, linfocitos B y/o productos de linfocitos B también se beneficiarían de tratamiento anti-CS1, incluyendo la enfermedad de las crioglobulinas, enfermedades inmunovesiculares (incluyendo penfigoide vesicular, pénfigo, dermatitis herpetiforme, enfermedad de IgA lineal, la epidermolisis ampollosa adquirida), crioglobulinemia mixta, hipergammaglobulinemia, síndrome de Sjogren, anemia autoinmunitaria, asma, miastenia grave, esclerosis múltiple, inflamación de miocardio o de pericardio, dermatitis atópica, psoriasis, liquen mixedematoso y enfermedad de Gaucher.

Además, no se han realizado estudios antes de examinar la viabilidad de utilizar anticuerpos anti-CS1 para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y cánceres de células plasmáticas, incluyendo mieloma y leucemia de células plasmáticas. Un anticuerpo terapéutico ideal debería unirse principalmente a las células diana. La unión a otras células y tejidos puede causar daño potencial a las células y tejidos y/o reducir el anticuerpo terapéutico de modo que se requiere administrar al paciente una cantidad en exceso del anticuerpo a fin de conseguir la eficacia del tratamiento deseado. Más importante aún, un anticuerpo que se une a las plaquetas puede tener efectos secundarios, como por ejemplo, activación de plaquetas (que puede conducir a coagulación excesiva), o la disminución de plaquetas (que puede conducir a insuficiencia de coagulación de la sangre). Por lo tanto, no suele ser viable utilizar un anticuerpo como agente terapéutico si el anticuerpo se une a múltiples células y tejidos, especialmente si se une a las plaquetas. La presente descripción se basa en parte en este descubrimiento de que no hay ninguna expresión significativa de proteína CS1 detectada en plaquetas, glóbulos rojos, las HuVEC, células de riñón, células de las vías respiratorias bronquiales, células pequeñas de las vías respiratorias, células de próstata, células del hígado y las células de mama. En consecuencia, la presente descripción ha demostrado la viabilidad de utilizar anticuerpos anti-CS1 como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, y cánceres de células plasmáticas, incluyendo el mieloma y la leucemia de células plasmáticas.

La presente descripción, por lo tanto, se refiere a los antagonistas que se unen a CS1. Las formas de realización ilustrativas de dichas formas de realización incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo anti-CS1 neutralizantes. Los anticuerpos neutralizan por lo menos una actividad biológica de CS1, en los que dichos anticuerpos se unen a CS1 y son capaces de por lo menos una de las actividades seleccionadas del grupo que consiste en: (a) la inhibición de la secreción de inmunoglobulinas y/o la producción por linfocitos; y (b) provocar la lisis de células que expresan CS1.

Conforme a los objetivos resumidos anteriormente, la presente invención proporciona nuevos procedimientos para el tratamiento de diversos trastornos, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios y diversas enfermedades cancerosas definidas, incluyendo varias formas de mieloma. También se proporcionan procedimientos para la evaluación del diagnóstico y pronóstico de dichos trastornos, así como métodos para la detección de composiciones que modulan dichas enfermedades. La presente invención también proporciona procedimientos de seguimiento de la eficacia terapéutica de dicho tratamiento, incluyendo el seguimiento y la detección de marcadores expresados selectivamente en dichos trastornos.

En particular, la identificación de marcadores expresados selectivamente en los trastornos autoinmunitarios, tales como LED, AR y EII, y las afecciones cancerosas, tales como mieloma y leucemia de células plasmáticas, permite el uso de esta expresión en procedimientos de diagnóstico, pronóstico o terapéutico. Como tal, la invención define varias composiciones, por ejemplo, ácidos nucleicos, polipéptidos, anticuerpos y moléculas pequeñas agonistas/antagonistas, que será útil para identificar selectivamente esos marcadores. Los marcadores pueden ser útiles para la caracterización molecular de los subconjuntos de las enfermedades, cuyos subconjuntos pueden realmente requerir varios tratamientos diferentes. Además, los marcadores también pueden ser importantes en las enfermedades relacionadas con trastornos autoinmunitarios, mieloma y leucemia de células plasmáticas, por ejemplo, que afectan a tejidos similares como en dichas enfermedades, o tienen mecanismos similares de inducción/mantenimiento. Por ejemplo, los procesos tumorales o característicos también pueden ser dirigidos. Las utilizaciones de diagnóstico y pronóstico se ponen a disposición, por ejemplo, para el subconjunto relacionado pero distintas enfermedades, para diferenciar las etapas de mieloma de los trastornos autoinmunitarios, o leucemia de células plasmáticas o para determinar la estrategia de tratamiento de tales afecciones. Los métodos de detección puede estar basados en ácidos nucleicos, por ejemplo, RCP o técnicas de hibridación, o proteína, por ejemplo, ELISA, detección por la imagen, IHC, etc. El diagnóstico puede ser cualitativo o cuantitativo, y puede detectar aumentos o disminuciones en los niveles de expresión.

Definiciones

El término "proteína CS1" o "polinucleótido CS1" o "transcrito asociado a CS1" se refiere a ácidos nucleicos y variantes polimórficas de polipéptidos, alelos, mutantes y homólogos entre especies que: (1) tienen una secuencia de nucleótidos que tiene más de aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, de identidad de secuencia de nucleótidos preferentemente alrededor de 92%, 94%, 96%, 97%, 98% o 99% o mayor identidad de secuencia de nucleótidos, preferentemente de más de una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos, a una secuencia nucleotídica de o asociada al gen de CS1 (Tabla 2), la unión del gen de CS1 (Tabla 2) a las parejas de unión, por ejemplo, anticuerpos policlonales, producidos contra un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica de o asociada al gen de CS1 (Tabla 2), y las variantes modificadas de manera conservadora de los mismos, (3) se hibridan específicamente en condiciones severas de hibridación a una secuencia de ácido nucleico, o su complemento de CS1 (Tabla 2) y variantes modificadas de los mismos de manera conservadora, o (4), tienen una secuencia de aminoácidos que tiene más de aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, de identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, o 99% o mayor identidad de secuencia de aminoácidos, preferentemente en una región de más de una región de al menos aproximadamente 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos de o asociada al gen de CS1 (Tabla 2). Un polinucleótido o secuencia de polipéptido suele ser de un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, primate, por ejemplo, humano; roedor, por ejemplo, rata, ratón, hámster, vaca, cerdo, caballo, oveja u otro mamífero. Un "polipéptido CS1" y un "polinucleótido CS1", incluyen tanto las formas naturales como recombinantes.

TABLA 2

SEC ID n°:1

Factor principal PDL: 433671 Secuencia de ADN
Acceso a ácido nucleico #: NM_021181

1	cttccagaga	gcaatatggc	tgggtcccca	acatgcctca	ccctcatcta	tatcctttgg
61	cagctcacag	ggtcagcagc	ctctggaccc	gtgaaagagc	tggtcgggtc	cggtgggtggg
121	gccgtgactt	tccccctgaa	gtccaaagta	aagcaagttg	actctattgt	ctggaccttc
181	aacacaaccc	ctcttgctcac	catacagcca	gaagggggca	ctatcatagt	gacccaaaat
241	cgtaataggg	agagagtaga	cttcccagat	ggaggctact	ccctgaagct	cagcaaaactg
301	aagaagaatg	actcagggat	ctactatgtg	gggatataca	gctcatcact	ccagcagccc
361	tccacccagg	agtacgtgct	gcatgtctac	gagcacctgt	caaagcctaa	agtcaccatg
421	ggctctgcaga	gcaataagaa	tggcacctgt	gtgaccaatc	tgacatgctg	catggaacat
481	ggggaagagg	atgtgattta	tacctggaag	gccctggggc	aagcagccaa	tgagtcccat
541	aatgggtcca	tcctccccat	ctcctggaga	tggggagaaa	gtgatatgac	cttcatctgc
601	gttgccagga	accctgtcag	cagaaaacttc	tcaagcccca	tccttgccag	gaagctctgt
661	gaaggtgctg	ctgatgaccc	agattcctcc	atggtcctcc	tgtgtctcct	gttgggtgcc
721	ctcctgctca	gtctctttgt	actggggcta	tttctttggt	ttctgaagag	agagagacaa
781	gaagagtaca	ttgaagagaa	gaagagagtg	gacatttgct	gggaaactcc	taacatatgc
841	cccattctg	gagagaacac	agagtacgac	acaatccctc	acactaatag	aacaatccta
901	aaggaagatc	cagcaaatac	ggtttactcc	actgtggaaa	taccgaaaaa	gatggaaaat
961	ccccactcac	tgctcacgat	gccagacaca	ccaaggctat	ttgcctatga	gaatgttatc
1021	tagacagcag	tgcactcccc	taagtctctg	ctcaaaaaaa	aaacaattct	cggcccaaag
1081	aaaacaatca	gaagaattca	ctgatttgac	tagaaacatc	aaggaagaat	gaagaacgtt
1141	gacttttttc	caggataaat	tatctctgat	gcttcttttag	atttaagagt	tcataattcc

```

1201 atccactgct gagaaatctc ctcaaaccca gaaggtttaa tcacttcac ccaaaaatgg
1261 gatttgtgaat gtcagcaaac cataaaaaaa gtgcttagaa gtattcctat agaaatgtaa
1321 atgcaaggctc acacatatta atgacagcct gttgtattaa tgatggctcc aggtcagtg
1381 ctggagtttc attccatccc agggcttgga tgtaaggatt ataccaagag tcttgctacc
1441 agggagggcaa gaagaccaa acagacagac aagtcacga gaagcagatg cacctgacaa
1501 aaatggatgt attaattggc tctataaact atgtgccag cactatgctg agcttacact
1561 aattggctcag acgtgctgtc tgccctcatg aaattggctc caaatgaatg aactacttc
1621 atgagcagtt gtagcaggcc tgaccacaga ttcccagagg gccagggtgtg gatccacagg
1681 acttgaagggt caaagttcac aaagatgaag aatcagggtg gctgaccatg tttggcagat
1741 actataatgg agacacagaa gtgtgcatgg cccaaggaca aggacctcca gccaggcttc
1801 atttatgcac ttgtgctgca aaagaaaagt ctagggttta aggctgtgcc agaaccatc
1861 ccaataaaga gaccgagctc gaagtccatc tgtaaactca gtgtaggaga cttggagtc
1921 ggcagtgaga ctggtggggc acggggggca gtgggtactt gtaaaccttt aaagatggtt
1981 aattcattca atagatattt attaagaacc tatgcggccc ggcattggtg ctcacacctg
2041 taatcccagc actttgggag gccaaagggtg gtgggtcatc tgaggtcagg agttcaagac
2101 cagcctggcc aacatggtga aaccccatct ctactaaaga tacaaaaatt tgctgagcgt
2161 ggtggtgtgc acctgtaatc ccagctactc gagaggccaa ggcattgaga tcgcttgaac
2221 ctgggaggtg gaggttgcat tgagctgaga tggcaccact gcactccggc ctaggcaacg
2281 agagcaaaac tccaatacaa acaacaacac aaacacctgt gctaggtcag tctggcacgt
2341 aagatgaaca tccttaccac cacagagctc accatctctt atacttaagt gaaaaacatg
2401 ggggaagggga aaggggaatg gctgcttttg atatgttccc tgacacatat cttgaatgga
2461 gacctcccta ccaagtgatg aaagtgttga aaaacttaat aacaaatgct tgttgggcaa
2521 gaatgggatt gaggattatc ttctctcaga aaggcattgt gaaggaattg agccagatct
2581 ctctccctac tgcaaaaccc tattgtagta aaaaagtctt ctttactatc ttaataaaac
2641 agatattgtg agattcaaaa aaaaaaaaaa aa

```

SEC ID nº:2

Secuencia de aminoácidos - CS1

5 GI:19923571|ref|NM_021181.3| Homo sapiens miembro 7 de la familia SLAM (SLAM F7)

**MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAAAGPVELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPLVTIQPEGG
TIIVTQNRNRERVDPPDGGYSKLKSLKKNDSGIYVVGIIYSSSLQQPSTQEQYVLHVYEHLSKPKVTMG
LQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRN
FSSPILARKLCEGAADDPDSSMVLLCLLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKREKQEEYIEKKRVDICRETP
NICPHSGENTEYDTIPHTNRTILKEDPANTVYSTVEIPKKMENPHSLLTMPDTPRLFAYENVI**

10 Una proteína CS1 o ácido nucleico "completo" se refiere a una secuencia polipeptídica o polinucleotídica de CS1, o una variante de la misma, que contiene elementos contenidos normalmente en una o más secuencias naturales, polinucleotídica o polipeptídica natural tipo CS1. La "completo" puede ser antes de, o después de, varias etapas de tratamiento o corte y empalme después de la traducción, incluyendo corte y empalme alternativo.

15 La expresión "muestra biológica" como se utiliza en la presente memoria es una muestra de tejido biológico o líquido que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo, de una proteína CS1, polinucleótido, o transcrito. Dichas muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido aislado de primates, por ejemplo, seres humanos, o roedores, por ejemplo, ratones y ratas. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsias y autopsias, secciones congeladas tomadas a efectos histológicos, muestras de archivo, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, cabello, piel, etc. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados procedentes de los tejidos del paciente. Una muestra biológica se obtiene por lo general de un organismo eucariótico, más preferentemente de un mamífero tal como un primate, por ejemplo, chimpancé o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo, cobaya, rata, ratón, conejo; o un ave; reptil; o pez. El ganado y los animales domésticos son de interés.

25 "Proporcionar una muestra biológica" significa obtener una muestra biológica para su utilización en los procedimientos descritos en la presente invención. Con mucha frecuencia, esto se realizará tomando una muestra de células de un animal, pero también se puede realizar utilizando células previamente aisladas (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento, y/o con otro objeto), o llevando a cabo los procedimientos de la invención *in vivo*. Los tejidos o materiales de archivo, que tienen tratamiento o resultados de anamnesis, serán especialmente útiles.

35 Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de restos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales (por ejemplo, aproximadamente 70% de identidad, preferentemente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99%, o mayor identidad en una región especificada, cuando se comparan y se alinean para una correspondencia máxima en un intervalo de comparación o región designada) según se mide utilizando, por ejemplo, algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos a continuación, o por alineación manual e inspección

visual. Dichas secuencias se dice entonces que son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere, o puede aplicarse, al complemento de una secuencia de prueba. La definición incluye también secuencias que tienen eliminaciones y/o inserciones, sustituciones y, por ejemplo, variantes polimórficas o alélicas naturales y variantes artificiales. Como se describe a continuación, los algoritmos preferidos pueden explicar huecos y similares.

Preferentemente, la identidad existe en una región que tiene por lo menos aproximadamente 25 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferentemente en una región que tiene alrededor de 50 a 100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

Para la comparación de secuencias, por lo general una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencia, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Preferentemente, pueden utilizarse los parámetros por defecto del programa, o pueden diseñarse parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces las identidades de secuencias por ciento para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Un "intervalo de comparación", como se utiliza en la presente memoria, incluye la referencia a un segmento de posiciones contiguas seleccionadas de entre el grupo que consta por lo general de aproximadamente 20 a 600, por lo general alrededor de 50 a 200, más habitualmente alrededor de 100 a 150, en el que una secuencia puede compararse con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez las dos secuencias están alineadas óptimamente. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos. La alineación óptima de secuencias para la comparación se puede realizar, por ejemplo, por el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, por el algoritmo de alineación de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, por la búsqueda por el método de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 85:2444-2448, por aplicaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o por alineación manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.* (Eds. 1995 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley).

Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencias y similitud de secuencias incluyen los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que están descritos en Altschul, *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. BLAST y BLAST 2.0 se utilizan, con los parámetros descritos en la presente memoria, para determinar el porcentaje de identidad de secuencias de los ácidos nucleicos y las proteínas de la invención. El programa informático para realizar análisis BLAST está disponible al público a través en el National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar la identificación de pares de secuencias de alta puntuación (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia problema, que o bien corresponden o satisfacen algunas puntuaciones umbral T de valor positivo cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de la base de datos. T se refiere al umbral de puntuación de la palabra próxima (Altschul, *et al.*, más arriba). Estos aciertos iniciales de las palabras próximas actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar las HSP más largas que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como la puntuación de la alineación acumulada pueda aumentarse. Las puntuaciones acumulativas se calculan utilizando, por ejemplo, para secuencias de nucleótidos, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre >0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre <0). Para calcular la puntuación acumulada en secuencias de aminoácidos, se utiliza una matriz de puntuación. Extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada disminuye en la cantidad X de su valor máximo conseguido; la puntuación acumulada llega a cero o menos, debido a la acumulación de una o más alineaciones de restos con puntuación negativa; o se alcanza el final de una de las secuencias. Los parámetros W, T y X del algoritmo BLAST determinan la sensibilidad y velocidad de la alineación. El programa BLASTN (para secuencias de nucleótidos) utiliza por defecto una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4 y una comparación de ambas cadenas. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP utiliza por defecto una longitud de palabra de 3, y expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 89:10915-919) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = -4, y una comparación de ambas cadenas.

El algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Véase, por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA.* 90:5873-5787. Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la que una coincidencia entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se produciría por casualidad. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que aproximadamente 0,2, más preferentemente menos de aproximadamente 0,01, y aún más preferentemente menor de aproximadamente 0,001. Los valores de registro pueden ser números grandes negativos, por ejemplo, 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

Una indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que el polipéptido

codificado por el primer ácido nucleico es inmunológicamente reactivo en cruz con los anticuerpos dirigidos contra el polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico. Así pues, un polipéptido por lo general es sustancialmente idéntico a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo por sustituciones conservadoras. Otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones severas. Aún otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que pueden utilizarse los mismos cebadores para ampliar las secuencias.

Una "célula hospedadora" es una célula natural o una célula transformada que contiene un vector de expresión y apoya la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedadoras pueden ser células cultivadas, explantes, células *in vivo*, y similares. Las células hospedadoras pueden ser células procarióticas tales como *E. coli*, o células eucarióticas tales como levaduras, de insectos, de anfibios, o células de mamífero tales como CHO, HeLa, de mieloma, y similares (véase, por ejemplo, el catálogo de la American Type Culture Collection o la página web).

La terminología "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refiere a material que está sustancial o esencialmente sin componentes que normalmente lo acompañan como se encuentra en su estado natural. La pureza y la homogeneidad se suelen determinar utilizando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliácridamida o cromatografía líquida de alta resolución. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en un preparado está sustancialmente purificada. En particular, un ácido nucleico aislado está separado de algunos marcos de lectura abiertos que flanquean naturalmente el gen y codifican otras proteínas aparte de la proteína codificada por el gen. El término "purificado" en algunas formas de realización indica que un ácido nucleico o proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Preferentemente, esto significa que el ácido nucleico o proteína es al menos aproximadamente 85% puro, más preferentemente al menos 95% puro, y aún más preferentemente al menos 99% puro. "Purificar" o "purificación", en otras formas de realización significa la eliminación de por lo menos un contaminante o componente de la composición que debe purificarse. En este sentido, la purificación no necesita que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100% puro.

Los términos "polipéptido", "péptido" y "proteína" se utilizan indistintamente en este documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido natural, así como a polímeros de aminoácidos naturales, aquellos que contienen restos modificados, y polímeros de aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de manera similar a los aminoácidos de origen natural. Aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato y O-fosfoserina. Análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que un aminoácido de origen natural, por ejemplo, un carbono α que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metil sulfonio de metionina. Dichos análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o peptídicos modificados, pero conservan alguna estructura química básica como un aminoácido de origen natural. Mimético de aminoácido se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de manera similar a otro aminoácido.

Los aminoácidos pueden citarse en la presente memoria por cualquiera de sus símbolos de tres letras comúnmente conocidos o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Los nucleótidos, del mismo modo, pueden ser citados por sus códigos de una sola letra comúnmente aceptados.

"Variante modificada de manera conservadora" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias específicas de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refiere a los ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo, secuencias contiguas naturales. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por ejemplo, cada uno de los codones GCA, GCC, GCG, y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición en la que un codón especifica una alanina, el codón se puede alterar a otro de los correspondientes codones descritos sin alterar el polipéptido codificado. Dichas variaciones de ácido nucleico son "variaciones imperceptibles", que son una especie de variaciones modificadas de manera conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente memoria que codifica un polipéptido también describe variaciones imperceptibles del ácido nucleico. En determinados contextos cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el codón exclusivo para metionina, y TGG, que es ordinariamente el codón exclusivo para triptófano) puede modificarse para producir una molécula funcionalmente similar. Por consiguiente, una variación imperceptible de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no necesariamente con respecto a las secuencias de sonda reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que cada una de las sustituciones, eliminaciones o adiciones a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido o de proteína que altera, añade o elimina un solo aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de manera conservadora" donde la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustitución conservadora que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas. Dichas variantes modificadas de forma conservadora existen además de las variantes polimórficas, homólogos interespecies y alelos de la invención y no excluyen los mismos. Por lo general las sustituciones conservadoras incluyen uno por otro: 1) Alanina (A), Glicina (G); 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); 3) Asparagina (N), Glutamina (Q); 4) Arginina (R), Lisina (K); 5) Isoleucina (I), leucina (L), Metionina (M), Valina (V); 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W); 7) Serina (S), Treonina (T), y 8) Cisteína (C), Metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* Freeman).

Pueden describirse estructuras macromoleculares tales como las estructuras polipeptídicas en términos de varios niveles de organización. Para una exposición general de esta organización, véase, por ejemplo, Alberts, *et al.* (eds. 2001) *Molecular Biology of the Cell* (4ª ed.) Garland; y Cantor y Schimmel (1980) *Biophysical Chemistry Part I: The Conformation of Biological Macromolecules* Freeman. "Estructura primaria" se refiere a la secuencia de aminoácidos de un péptido concreto. "Estructura secundaria" se refiere a estructuras tridimensionales localmente ordenadas, dentro de un polipéptido. Estas estructuras se conocen comúnmente como dominios. Los dominios son porciones de un polipéptido que a menudo forman una unidad compacta del polipéptido y son por lo general 25 a aproximadamente 500 aminoácidos de longitud. Los dominios típicos están hechos de secciones de menor organización, tales como tramos de lámina β y hélices α . "Estructura terciaria" se refiere a la estructura tridimensional completa de un monómero polipeptídico. "Estructura cuaternaria" se refiere a la estructura tridimensional formada, habitualmente por asociación no covalente de unidades terciarias independientes. Términos anisotrópicos también son conocidos como términos de energía.

Las expresiones "ácido nucleico", "oligonucleótido" o "polinucleótido" o equivalentes gramaticales utilizados en la presente memoria significa por lo menos dos nucleótidos unidos por enlace covalente. Los oligonucleótidos suelen ser de aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50, o más nucleótidos de longitud, hasta aproximadamente 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y los polinucleótidos son unos polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo, 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico de la presente invención contendrá generalmente enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos, los análogos de ácidos nucleicos que se incluyen pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo, enlaces de fosforamidoato, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforoamidita (véase Eckstein (1992) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* Oxford Univ. Press); y estructuras principales y enlaces de ácido péptido nucleico. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con estructuras principales positivas; estructuras principales no iónicas, y estructuras principales sin ribosa, incluyendo los descritos en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y los capítulos 6 y 7 del Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* ACS Symposium Series 580. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos están también incluidos dentro de una definición de ácidos nucleicos. Se puede hacer modificaciones de la estructura principal de ribosa-fosfato por varias razones, por ejemplo, para aumentar la estabilidad y la vida media de dichas moléculas en entornos fisiológicos o como sondas en un biochip. Se pueden preparar mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos; alternativamente, pueden prepararse mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos y mezclas de ácidos nucleicos de origen natural y análogos.

Varias referencias describen dichos análogos de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, fosforamidoato (Beaucage, *et al.* (1993) *Tetrahedron* 49:1925-1963 y las referencias en la misma; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800-3803; Sprinzl, *et al.* (1977) *Eur. J. Biochem.* 81:579-589; Letsinger, *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487-499; Sawai, *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger, *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470-4471; y Pauwels, *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26:141-149), fosforotioato (Mag, *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437-441; y patente US nº 5.644.048), fosforoditioato (Brill, *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321-2322), enlaces de O-metilfosforoamidita (véase Eckstein (1992) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press), y las estructuras principales y enlaces del ácido péptido nucleico (véase Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895-1897; Meier, *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008-1010; Nielsen (1993) *Nature* 365:566-568; Carlsson, *et al.* (1996) *Nature* 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen los que tienen estructuras principales positivas (Denpcy, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:6097-101; estructuras principales no iónicas (patentes US nº 5.386.023, nº 5.637.684, 5.602.240, nº 5.216.141, y nº 4.469.863; Kiedrowski, *et al.* (1991) *Angew. Chem. Intl. Ed. Inglesa* 30:423-426; Letsinger, *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470-4471; Letsinger, *et al.* (1994) *Nucleoside and Nucleotide* 13:1597, capítulos 2 y 3 en Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* ACS Symposium Series 580; Mesmaeker, *et al.* (1994) *Bioorganic and Medicinal Chem. Lett.* 4:395-398; Jeffs, *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; Horn, *et al.* (1996) *Tetrahedron Lett.* 37:743) y estructuras principales sin ribosa, incluyendo los descritos en las patentes US nº 5.235.033 y nº 5.034.506, y capítulos 6 y 7 en Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* ACS Symposium Series 580. Los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos también se incluyen dentro de una definición de ácidos nucleicos (véase Jenkins, *et al.* (1995) *Chem. Soc. Rev.* págs. 169-176). Varios análogos de ácidos nucleicos se describen en Rawls (página 35, 2 de junio 1997) *C & E News*.

Son particularmente preferidos los ácidos péptido nucleicos (APN) que incluyen análogos de ácidos péptido nucleicos. Los ácidos péptido nucleicos tienen cadenas principales hechas de unidades de N-(2-aminoetil)-glicina que se repiten unidas por enlaces peptídicos. Las diferentes bases (purinas y pirimidinas) están unidas a la estructura principal por enlaces metileno carbonilo. Estas estructuras principales son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, en contraste con la estructura principal de fosfodiéster muy cargada de los ácidos nucleicos de origen natural. Esto da como resultado por lo menos dos ventajas. La estructura principal de APN presenta mejor cinética de hibridación, produciendo un enlace más fuerte entre las cadenas APN/ADN, que entre las cadenas de APN y las cadenas de ADN. Los APN tienen grandes cambios en la temperatura de fusión (T_m) para pares de bases incompatibles frente a perfectamente compatibles. ADN y ARN presentan por lo general una disminución de 2 a 4°C en T_f para una incompatibilidad interna. Con la estructura principal del APN no iónico, la disminución es más próxima a 7-9°C. De manera similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas estructuras principales es relativamente insensible a la concentración salina. Además, los APN no son degradados por enzimas celulares, y por lo tanto puede ser más estables.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, o contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como de monocatenaria. La representación de una sola cadena también define la secuencia de la cadena complementaria, por lo tanto las secuencias descritas en la presente memoria también proporcionan el complemento de la secuencia. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribo-y ribo-nucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. "Transcripción" se refiere por lo general a un ARN de origen natural, por ejemplo, un pre-ARNm, ARNhn, o ARNm. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "nucleósido" incluye nucleótidos, nucleósidos y análogos de nucleótidos, y nucleósidos modificados, tales como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas de origen sintético. De este modo, por ejemplo, cada una de las unidades de un ácido péptido nucleico, que contiene cada una base, se denominan en la presente memoria nucleósido.

Una "marcador" o un "resto detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, fisiológicos, químicos u otros medios físicos. En general, los marcadores se dividen en tres clases: a) marcadores isotópicos, que pueden ser isótopos radioactivos o pesados; b) marcadores inmunitarios, que pueden ser anticuerpos, antígenos, o marcadores de epítipo; y c) colorantes coloreados o fluorescentes. Los marcadores se pueden incorporar en los ácidos nucleicos de CS1, proteínas y anticuerpos. Por ejemplo, el marcador debería ser capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. El resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S o ^{125}I , reactivos con abundantes electrones, un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, o luciferina, o una enzima (por ejemplo, como se utiliza comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas u otras entidades que pueden hacerse detectables tal como la fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o peroxidasa de rábano picante. Se conocen métodos para conjugar el anticuerpo con el marcador. Véase, por ejemplo, Hunter, *et al.* (1962) *Nature* 144:945; David, *et al.* (1974) *Biochemistry* 13:1014-1021; Pain, *et al.* (1981) *J. Immunol. Meth.* 40:219-230; y Nygren (1982) *J. Histochem. and Cytochem.* 30:407-412.

Un "efector", "resto efector" o "componente efector" es una molécula que se une (o se enlaza, o se conjuga), por enlace covalente, mediante un enlazador o un enlace químico, o por enlace no covalente, por enlace iónico, fuerzas de van der Waals, electrostático o enlaces de hidrógeno, a un anticuerpo. El "efector" puede ser una variedad de moléculas, incluyendo, por ejemplo, restos de detección que incluyen compuestos radiactivos, compuestos fluorescentes, enzimas o sustratos, etiquetas tales como etiquetas de epítipo, toxinas; restos activables, agentes quimioterapéuticos, antibióticos, lipasas; restos quimiotácticos, inmunomoduladores (micA/B) o radioisótopos, por ejemplo, emisores de radiación beta "dura".

Una "sonda marcada de ácido nucleico u oligonucleótido" es la que está unida, por ejemplo, por enlace covalente, mediante un enlazador o un enlace químico, o por enlace no covalente, por enlace iónico, fuerzas de van der Waals, electrostático o enlaces de hidrógeno a un marcador de tal manera que la presencia de la sonda se puede detectar detectando la presencia del marcador unido a la sonda. Alternativamente, los métodos que utilizan interacciones de gran afinidad pueden conseguir los mismos resultados, donde uno de un par de parejas de unión se une a la otra, por ejemplo, biotina, estreptavidina.

Tal como se utiliza en la presente memoria una "sonda de ácido nucleico u oligonucleótido" es un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria mediante uno o más tipos de enlaces químicos, normalmente por apareamiento de bases complementarias, por ejemplo, mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Como se utiliza en la presente memoria, una sonda puede incluir bases naturales (por ejemplo, A, G, C o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda pueden estar unidas por un enlace distinto de un enlace fosfodiéster, preferentemente el que no interfiere funcionalmente con la hibridación. Así, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos péptido nucleicos en los que las bases constituyentes están unidas por enlaces peptídicos en lugar de enlaces fosfodiéster. Las sondas pueden unir secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda dependiendo de la severidad de las condiciones de hibridación. Las sondas están preferentemente marcadas directamente, por

ejemplo, con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o marcadas indirectamente, por ejemplo, con biotina a la que después puede unirse un complejo de estreptavidina. Al analizar la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia de selección. El diagnóstico o pronóstico puede basarse en el nivel genómico, o en el nivel de ARN o de expresión de proteínas.

El término "recombinante" cuando se utiliza con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína, o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico heterólogo o proteína o la alteración de un ácido nucleico o proteína natural, o que la célula procede de una célula modificada de este modo. Así, por ejemplo, células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de lo contrario se expresan anormalmente, se subexpresan o no se expresan en absoluto. La expresión "ácido nucleico recombinante" en la presente memoria significa el ácido nucleico, originalmente formado *in vitro*, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, utilizando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De esta manera, se consigue el enlace operativo de secuencias diferentes. Por lo tanto un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado *in vitro* por moléculas de ADN de ligadura que normalmente no están unidas, se consideran ambos como recombinantes para la presente invención. Se entiende que una vez construido un ácido nucleico recombinante y reintroducido en una célula u organismo hospedador, se multiplicará de forma no recombinante, por ejemplo, utilizando la organización celular *in vivo* de la célula hospedadora en lugar de manipulaciones *in vitro*, sin embargo, dichos ácidos nucleicos, una vez producidos por técnicas de recombinación, aunque posteriormente multiplicados por técnicas no de recombinación, aún se consideran recombinantes para la invención.

Asimismo, una "proteína recombinante" es una proteína producida utilizando técnicas recombinantes, por ejemplo, mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante tal como se ha representado anteriormente. Una proteína recombinante se distingue de la proteína natural por lo menos en una o más características. La proteína se puede aislar o purificar lejos de alguna o la mayoría de las proteínas y compuestos con los que se asocia normalmente en su hospedador natural, y por lo tanto puede ser sustancialmente pura. Una proteína aislada no está acompañada por al menos algo del material con el que está asociada normalmente en su estado natural, preferentemente constituyendo por lo menos aproximadamente 0,5%, más preferentemente por lo menos aproximadamente 5% en peso de la proteína completa en una muestra dada. Una proteína sustancialmente pura comprende por lo menos aproximadamente 75% en peso de la proteína completa, prefiriéndose por lo menos aproximadamente 80% y prefiriéndose especialmente por lo menos aproximadamente 90%. La definición incluye la producción de una proteína CS1 de un organismo en un organismo o célula hospedadora diferente. Alternativamente, la proteína se puede construir a una concentración significativamente más alta que la que se ve normalmente, mediante la utilización de un activador inducible o un activador de sobreexpresión, de tal manera que la proteína se construye a niveles de concentración aumentados. Alternativamente, la proteína puede estar en una forma que normalmente no se encuentra en la naturaleza, como en la adición de una etiqueta de epítipo o sustituciones, inserciones y eliminaciones de aminoácidos, como se expone a continuación.

El término "heterólogo", cuando se utiliza con referencia a las porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se suele producir de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, por ejemplo, a partir de genes no relacionados dispuestos para construir un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un activador de una fuente y una región codificadora de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga con frecuencia se referirá a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un "activador" es por lo general una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se utiliza en la presente memoria, un activador incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del punto de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un activador de polimerasa tipo II, un elemento de TATA. Un activador también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar situados tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un activador "constitutivo" es un activador que es activo en la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un activador "inducible" es activo en la regulación ambiental o del desarrollo. La expresión "operativamente unido" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un activador, o matriz de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, por ejemplo, en el que la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

Un "vector de expresión" es un montaje de ácido nucleico, generado por recombinación o síntesis, con una serie de elementos especificados de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico específico en una célula hospedadora. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Por lo general, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que debe transcribirse en enlace operativa a un activador.

La frase "selectivamente (o específicamente) se hibrida a" se refiere al enlace, duplicado o hibridación de una

molécula de forma selectiva a una secuencia de nucleótidos específica en condiciones de hibridación severas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, celular total o genoteca de ADN o ARN).

La frase "condiciones de hibridación severas" se refiere a las condiciones en las que una sonda se hibridará con su subsecuencia diana, por lo general en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no con otras secuencias. Las condiciones severas dependen de la secuencia y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a temperaturas más altas. Una guía extensa para la hibridación de ácidos nucleicos se encuentra en "Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays" en Tijssen (1993) *Hybridization with Nucleic Probes* (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology) (vol. 24) Elsevier. Generalmente, se seleccionan condiciones severas que son de aproximadamente 5 a 10°C más baja que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a un pH de fuerza iónica definida. La T_m es la temperatura (bajo una fuerza iónica, pH y concentración de ácido nucleico definidos) a la que 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan con la secuencia diana en equilibrio (como las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m, el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones severas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor de aproximadamente 1,0 M de ion sodio, por lo general una concentración de ion sodio (u otras sales) de aproximadamente 0,01 a 1,0 M a un pH de 7,0 a 8,3 y la temperatura es por lo menos aproximadamente 30°C para sondas cortas (por ejemplo, de aproximadamente 10 a 50 nucleótidos) y por lo menos aproximadamente 60°C para sondas largas (por ejemplo, más de aproximadamente 50 nucleótidos). Las condiciones severas también se pueden conseguir con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es por lo general por lo menos el doble del fondo, preferentemente 10 veces la hibridación de fondo. Ejemplos de condiciones severas de hibridación pueden ser los siguientes: 50% de formamida, 5 x SSC, y 1% de SDS, incubando a 42°C, o, 5x SSC, SDS al 1%, incubando a 65°C, con lavado en 0,2 x SSC, y 0,1% de SDS a 65°C. Para la RCP, una temperatura de aproximadamente 36°C es típica para la ampliación a baja severidad, aunque las temperaturas de hibridación pueden oscilar entre aproximadamente 32° y 48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para la ampliación por RCP a alta severidad, es típica una temperatura de aproximadamente 62°C, aunque las temperaturas de hibridación a alta severidad puede oscilar entre aproximadamente 50 y 65°C, dependiendo de la longitud y la especificidad del cebador. Las condiciones cíclicas típicas tanto para las ampliaciones de alta como baja severidad incluyen una fase de desnaturalización de 90 a 95°C durante 30 a 120 segundos, una fase de hibridación que dura 30 a 120 segundos, y una fase de ampliación de aproximadamente 72°C durante 1 a 2 min. Se proporcionan protocolos y directrices para las reacciones de ampliación a baja y alta severidad, por ejemplo, en Innis, *et al.* (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, NY.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones severas son aún sustancialmente idénticos si los polipéptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando una copia de un ácido nucleico se crea utilizando la máxima degeneración de codones permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos suelen hibridarse en condiciones de hibridación moderadamente severas. Ejemplos de "condiciones de hibridación moderadamente severas" incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1 M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva suele ser por lo menos dos veces el fondo. Pueden utilizarse condiciones de hibridación y lavado alternativas para proporcionar condiciones de severidad similar. Para la determinación de parámetros de hibridación se proporcionan otras directrices en numerosas referencias, por ejemplo, Ausubel, *et al.* (Eds. 1991 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley.

La frase "cambios en la morfología celular" o "cambios en las características celulares" se refiere a cualquier cambio en la morfología celular o en las características de proliferación *in vitro* o *in vivo*, tales como la viabilidad celular, el crecimiento celular, la secreción de factores de crecimiento o quimiocinas, los cambios en la morfología celular, ganancia o pérdida de marcadores específicos de inflamación, capacidad para provocar o suprimir la inflamación cuando se inyecta en animales hospedadores adecuados, y/o la inducción de un estado de enfermedad en hospedadores adecuados, por ejemplo, trastornos autoinmunitarios y afecciones cancerosas. Véase, por ejemplo, págs. 231-241 en Freshney (1994) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (2^a ed.) Wiley-Liss.

"Células enfermas" se refiere a cambios fenotípicos espontáneos o provocados que no implican necesariamente la captación de nuevo material genético. Por ejemplo, aunque la formación de mieloma puede surgir de una infección con un virus transformante y la incorporación de nuevo ADN genómico, o la captación de ADN exógeno, también puede surgir espontáneamente o tras la exposición a un agente, provocando de ese modo la expresión o la alteración de un gen existente. El crecimiento tumoral se asocia con cambios en la expresión fenotípica y de proteínas, tales como cambios morfológicos, el crecimiento celular anómalo, y/o cambios morfológicos. Véase, Freshney (2000) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (4^a ed.) Wiley-Liss. De manera similar, las células afectadas por procesos de enfermedades autoinmunitarias también están asociados a cambios en la expresión fenotípica y de proteínas.

Por una cantidad "eficaz" de una molécula, de un anticuerpo o de un fármaco o agente farmacológicamente activo o formulación farmacéutica se entiende una cantidad suficiente de la molécula, anticuerpo, fármaco, agente o formulación para proporcionar el efecto deseado.

Un "sujeto" o "paciente" se utiliza indistintamente en la presente memoria, que se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consta de uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Los genes de inmunoglobulina reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de la región variable de inmunoglobulina V (tal como se indica a continuación, existen genes V tanto para la cadena pesada H como para la cadena ligera L). Las "cadenas ligeras" completas de inmunoglobulina (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable, V-kappa o V-lambda, en el extremo NH₂ (aproximadamente 110 aminoácidos) y, respectivamente, un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las "cadenas pesadas" completas de inmunoglobulina (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos), están igualmente codificadas por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero y consta de dos pares idénticos de cadenas de inmunoglobulina, teniendo cada par una cadena ligera y una pesada. En cada par, las regiones variables de cadena ligera y pesada son conjuntamente responsables de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. Además de los anticuerpos tetraméricos, las inmunoglobulinas pueden existir en varias otras formas incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y (Fab)₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo, Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo, Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426 (1988)). (Véase, en general, Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, NY, 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323, 15-6 (1986)).

Una región variable de cadena ligera o pesada de inmunoglobulina consta de una región "marco" interrumpido por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR). La ampliación de la región marco y de las CDR se ha definido con precisión (véase, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat *et al.*, U.S. Department of Health and Human Services, (1983)). Las secuencias de las regiones marco de cadenas ligera o pesada diferente se conservan relativamente en una especie. Como se utiliza en la presente memoria, una "región marco humana" es una región marco que es sustancialmente idéntica (aproximadamente 85% o más, normalmente 90 a 95% o más) a la región marco de una inmunoglobulina humana natural. La región marco de un anticuerpo, que es las regiones marco combinadas de las cadenas ligeras y pesadas constituyentes, sirve para posicionar y alinear las CDR. Las CDR son principalmente responsables de la unión a un epítipo de un antígeno.

Los anticuerpos también existen, por ejemplo, como un número de fragmentos bien caracterizados producidos por digestión con varias peptidasas. Así, por ejemplo, la pepsina digiere un anticuerpo debajo de los enlaces disulfuro en la región bisagra para producir F(ab)₂, dímero de Fab que el mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_{H1} por un enlace disulfuro. El F(ab)₂ puede reducirse en condiciones suaves para romper el enlace disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de este modo el dímero F(ab)₂ en un monómero Fab'. El monómero Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase Paul (ed. 1999) Fundamental Immunology (4ª ed.) Raven. Mientras que diversos fragmentos de anticuerpo se definen desde el punto de vista de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que dichos fragmentos pueden sintetizarse *de novo* bien químicamente o utilizando metodología de ADN recombinante. Por lo tanto, el término anticuerpo, como se utiliza en la presente memoria, también incluye fragmentos de anticuerpos ya sea producidos por la modificación de anticuerpos enteros, o los sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario) o los identificados utilizando bancos de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty, *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554).

Un "anticuerpo híbrido" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia de modo que el punto de unión al antígeno (región variable) está unido a una región constante de una clase diferente o alterada, y/o especies, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo híbrido, por ejemplo, una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, función efectora, agente quimiotáctico, inmunomodulador, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, se altera, sustituye o intercambia por una región variable que tiene una especificidad para el antígeno diferente o alterada.

El término "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un marco humano, al menos uno y preferentemente todas las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano, y en el que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos aproximadamente 85 a 90%, preferentemente al menos 95% idéntica. Por lo tanto, todas las partes de una inmunoglobulina humanizada, excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a las partes correspondientes de una o más secuencias de inmunoglobulina humana naturales. Véase, por ejemplo Queen *et al.*, patentes US nº 5.530.101; nº 5.585.089; nº 5.693.761; nº 5.693.762 y nº 6.180.370.

Se conocen muchas técnicas para la preparación de anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, monoclonales o policlonales. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72; Cole, *et al.* (1985) págs. 77-96 en Reisfeld y Sell (1985) *Monoclonal Antibodies and Myeloma Therapy* Liss; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Lippincott; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* CSH Press; y Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2ª ed.) Academic Press. Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (Patente US nº 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos contra polipéptidos de la presente invención. También se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Alternativamente, la tecnología de presentación en fagos puede utilizarse para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados. Véase, por ejemplo, McCafferty, *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554; Marks, *et al.* (1992) *Biotechnology* 10:779-783.

El término "epítipo" se refiere a cualquier porción (determinante) de una proteína que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria y que está unida específicamente por un anticuerpo. Determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupaciones con superficie activa de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales GAG y por lo general tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Dos anticuerpos se dice que se unen a sustancialmente el mismo epítipo de una proteína (o el epítipo superpuesto de una proteína) si las mutaciones de aminoácidos en la proteína que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo también reducen o eliminan la unión del otro anticuerpo, y/o si los anticuerpos compiten por la unión a la proteína, es decir, la unión de un anticuerpo a la proteína reduce o elimina la unión del otro anticuerpo. La determinación de si dos anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo se lleva a cabo por los métodos conocidos en la técnica, tales como un ensayo de competencia. En la realización de un estudio de competencia de anticuerpos entre un anticuerpo de control (por ejemplo, uno de los anticuerpos anti-CS1 descritos en la presente memoria) y cualquier anticuerpo de prueba, se puede marcar en primer lugar el anticuerpo de control con un marcador detectable, tal como, biotina, marcador enzimático, radiactivo o marcador fluorescente para permitir la identificación posterior. Un anticuerpo de ensayo (sin marcar) que se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo de control (marcado) debe poder bloquear la unión del anticuerpo de control y por lo tanto debe reducir la unión anticuerpo de control.

En una realización ilustrativa, si un anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo de un anticuerpo monoclonal Luc (anticuerpos monoclonales Luc se refieren a los anticuerpos monoclonales anti-CS1 producidos de la presente invención), el anticuerpo debe unirse a un epítipo de CS1 que se superpone con el epítipo de CS1 al que se une el anticuerpo monoclonal Luc. La región de solapamiento puede variar desde un resto de aminoácido a varios centenares de restos de aminoácidos. Este anticuerpo a continuación, debe competir con la unión del anticuerpo monoclonal Luc a CS1 y/o bloquearla y de este modo disminuir la unión del anticuerpo monoclonal Luc a CS1, preferentemente por lo menos aproximadamente 50% en un ensayo de competencia.

Un epítipo es reconocido por un anticuerpo cuando el epítipo se une al anticuerpo con una afinidad de unión de por lo menos 10^5 M^{-1} , preferentemente 10^6 a 10^7 M^{-1} , más preferentemente 10^8 a 10^9 M^{-1} , aún más preferentemente 10^{10} M^{-1} o más fuerte.

La expresión "procedente de" significa "obtenido a partir de" o "producido por" o "descendiente de".

Antígenos y anticuerpos de CS1

La SEC. ID. nº 2 representa las secuencias de aminoácidos de la CS1 humana natural completa. Un fragmento o derivado de CS1 "funcionalmente activo" muestra una o más actividades funcionales asociadas a una proteína CS1 natural, completa, tales como la actividad antigénica o inmunógena, la capacidad para unir sustratos celulares naturales, etc. La actividad funcional de las proteínas, derivados y fragmentos de CS1 se pueden ensayar por varios métodos conocidos por los expertos en la técnica (Current Protocols in Protein Science, Coligan *et al.*, Eds., John Wiley & Sons, Inc., Somerset, New Jersey (1998)). Para los propósitos en la presente memoria, los fragmentos funcionalmente activos incluyen también aquellos fragmentos que comprenden uno o más dominios estructurales de un polipéptido CS1, tales como un dominio de unión. Los dominios de proteínas pueden identificarse utilizando el programa PFAM (Bateman A., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27: 260-2 (1999)).

Los derivados de polipéptidos CS1 por lo general comparten un cierto grado de identidad de secuencia o similitud de secuencia con la SEC. ID. nº 2 o un fragmento de la misma. Los derivados de CS1 se pueden producir por varios métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que dan como resultado su producción puede ocurrir en genes o proteínas. Por ejemplo, una secuencia clonada de gen CS1 (por ejemplo, SEC. ID. nº 1) puede escindirse en sitios apropiados con endonucleasa(s) de restricción (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317: 415 (1986)), seguido por modificación enzimática adicional, si se desea, a continuación, se aísla y se liga *in vitro* y se expresa para producir el derivado deseado. Alternativamente, un gen de CS1 se pueden mutar *in vitro* o *in vivo* para crear y/o destruir secuencias de traducción, iniciación y/o de terminación, o para crear variaciones en regiones codificadoras y/o para formar nuevos sitios de endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar aún más la modificación *in vitro*. En la técnica se conocen varias técnicas de mutagenia, tales como mutagenia química, mutagenia dirigida *in vitro* (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 13: 4331 (1986)), o la utilización de enlazadores

TAB (disponible en Pfizer, Inc.).

En un aspecto, los anticuerpos utilizados en la presente descripción neutralizan al menos una, o preferentemente todas, las actividades biológicas de CS1. Las actividades biológicas de CS1 incluyen: 1) actividades de unión de sus sustratos celulares, tales como sus ligandos (por ejemplo, estos anticuerpos neutralizantes deben ser capaces de competir con o bloquear completamente la unión de CS1 a al menos una, y preferentemente todos, sus ligandos), 2) actividades de transducción de señalización; y 3) respuestas celulares inducidas por CS1.

La presente descripción proporciona estirpes celulares de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, Luc69, LucX.1, LucX.2 o Luc90. La estirpe celular de hibridoma Luc90 se ha depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) en PO Box 1549, Manassas, VA 20108, como número de registro PTA 5091. El depósito de esta estirpe celular de hibridoma se recibió en la ATCC el 26 de marzo de 2003. La estirpe celular de hibridoma Luc63 también se ha depositado en la ATCC en la dirección mencionada anteriormente. El depósito del anticuerpo Luc63 se recibió en la ATCC el 6 de mayo de 2004.

La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales producidos por las estirpes celulares de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, Luc69, LucX.1, LucX.2 o Luc90 (número de acceso ATCC PTA 5091). Estos anticuerpos monoclonales se denominan como los anticuerpos: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, Luc69, LucX.1, LucX.2 y Luc90, respectivamente, en lo sucesivo.

La presente descripción proporciona anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, que se unen sustancialmente al mismo epítipo que cualquiera de los anticuerpos monoclonales Luc descritos en la presente memoria.

La presente descripción proporciona anticuerpos, preferentemente anticuerpos monoclonales, que no se unen sustancialmente al mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos monoclonales Luc descritos anteriormente.

Una variedad de ensayos de detección inmunológicos para la evaluación de la competencia del anticuerpo se puede utilizar para identificar los anticuerpos que se unen a sustancialmente el mismo epítipo de un anticuerpo utilizado de acuerdo con la presente descripción o que se unen a un epítipo diferente del de un anticuerpo utilizado de acuerdo con la presente invención.

Al realizar un estudio de competencia de anticuerpos entre un anticuerpo de control y cualquier anticuerpo de prueba (independientemente de la especie o isotipo), en primer lugar se puede marcar la referencia con un marcador detectable, tal como, biotina o un marcador enzimático (o incluso radioactivo) para permitir la identificación posterior. En este caso, se podría premezclar o incubar el anticuerpo sin marcar con células que expresan la proteína CS1. El anticuerpo marcado se añade entonces a las células preincubadas. Se mide la intensidad del marcador unido. Si el anticuerpo marcado compite con el anticuerpo sin marcar por la unión a un epítipo de superposición, la intensidad disminuirá con relación a la unión por el anticuerpo sin marcar con referencia negativa (un anticuerpo conocido que no se une a CS1).

El ensayo puede ser cualquiera de una gama de ensayos inmunológicos basados en la competencia de anticuerpos, y los anticuerpos de control se detectarían mediante la detección de su marcador, por ejemplo, utilizando estreptavidina en el caso de anticuerpos biotinilados o utilizando un sustrato cromógeno en relación con un marcador enzimático (tal como sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) con la enzima peroxidasa) o, simplemente, detectando un marcador radiactivo o un marcador de fluorescencia. Un anticuerpo que se une al mismo epítipo que los anticuerpos de control será capaz de competir eficazmente por la unión y de este modo reducirá significativamente (por ejemplo, por lo menos el 50%) la unión al anticuerpo de control, como se demuestra por una reducción en el marcador unido.

La reactividad de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante sería el valor alto de referencia. El valor bajo de referencia se obtendría incubando los anticuerpos de prueba sin marcar con células que expresan CS1 y a continuación se incubaba la mezcla de células/anticuerpo con anticuerpos de control marcados del mismo tipo exactamente, cuando se produjera la competencia y redujera la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de prueba, una reducción significativa en la reactividad del anticuerpo marcado en presencia de un anticuerpo de prueba es indicativo de un anticuerpo de prueba que reconoce sustancialmente el mismo epítipo.

Los anticuerpos contra CS1 de todas las especies de orígenes se incluyen en la presente descripción. Los anticuerpos naturales ilustrativos no limitativos incluyen anticuerpos procedentes de seres humanos, pollos, cabras y roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámsteres y conejos), incluyendo roedores transgénicos modificados genéticamente para producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO 93/12227; patente US nº 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO 91/10741; patente US nº 6.150.584). Los anticuerpos naturales son los anticuerpos producidos por un animal hospedador después de ser inmunizado con un antígeno, tal como un polipéptido, preferentemente un polipéptido humano. En una forma de realización preferida, el anticuerpo

de la presente invención es un anticuerpo natural aislado que se une a CS1 y/o la neutraliza.

Los anticuerpos anti-CS1 alterados genéticamente deben ser funcionalmente equivalentes a los anticuerpos naturales mencionados anteriormente. Se prefieren los anticuerpos modificados que proporcionan estabilidad y/o eficacia terapéutica mejoradas. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen los que tienen sustituciones conservadoras de restos de aminoácidos, y una o más eliminaciones o adiciones de aminoácidos que no alteran de manera apreciable perjudicialmente la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden variar desde cambiar o modificar uno o más restos de aminoácidos para completar el rediseño de una región, siempre y cuando la utilidad terapéutica se mantenga. Los anticuerpos de la presente invención se pueden modificar después de la traducción (por ejemplo, acetilación, y/o fosforilación) o pueden modificarse por síntesis (por ejemplo, el acoplamiento de un grupo marcador). Los anticuerpos genéticamente alterados preferidos son anticuerpos híbridos y anticuerpos humanizados.

El anticuerpo híbrido es un anticuerpo que tiene una región variable y una región constante procedente de dos anticuerpos diferentes, preferentemente procedente de especies distintas. Preferentemente, la región variable del anticuerpo híbrido procede de la especie murina y la región constante procede de la especie humana.

En una forma de realización, las regiones variables murinas proceden de cualquiera de los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria. Para producir los anticuerpos híbridos, las partes procedentes de dos especies diferentes (por ejemplo, la región constante humana y la variable murina o región de unión) pueden unirse entre sí químicamente por técnicas convencionales o pueden prepararse como proteínas individuales contiguas utilizando técnicas de ingeniería genética. Las moléculas de ADN que codifican las proteínas tanto de fragmentos de la cadena ligera como de la cadena pesada del anticuerpo híbrido pueden expresarse como proteínas contiguas. El método de preparación de anticuerpos híbridos se describe en la patente US nº 5.677.427; la patente US nº 6.120.767 y la patente US nº 6.329.508.

Los anticuerpos alterados genéticamente utilizados en la presente invención incluyen anticuerpos humanizados que se unen y neutralizan a CS1. En una forma de realización, dicho anticuerpo humanizado que comprende las CDR de una inmunoglobulina donante de ratón, y los marcos de la cadena pesada y de la cadena ligera y las regiones constantes de una inmunoglobulina receptora humana. En un ejemplo, los anticuerpos humanizados son las versiones humanizadas de cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria. El procedimiento de preparación de anticuerpos humanizados se describe en las patentes US nº 5.530.101; nº 5.585.089; nº 5.693.761; nº 5.693.762 y nº 6.180.370.

Los anticuerpos anti-CS1 completamente humanos también están incluidos en la presente invención. En una forma de realización preferida de la presente invención, dichos anticuerpos completamente humanos son anticuerpos humanos aislados que neutralizan las actividades de CS1 descritas en la presente memoria.

Los anticuerpos contra CS1 completamente humanos se producen por diversas técnicas. Un ejemplo es la metodología trioma. El método básico y un ejemplo de pareja de fusión celular, SPAZ-4, para su utilización en este método han sido descritos por Oestberg *et al.*, Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg, patente US nº 4.634.664 y Engleman *et al.*, patente US nº 4.634.666.

Los anticuerpos humanos contra CS1 también se pueden producir a partir de animales no humanos transgénicos que tienen transgenes que codifican por lo menos un segmento del locus de inmunoglobulina humana. La producción y propiedades de los animales que tienen estas propiedades están descritas detalladamente por, véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO 93/12227; patente US nº 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO91/10741; patente US nº 6.150.584.

Se pueden utilizar también varias tecnologías recombinantes de banco de anticuerpos para producir anticuerpos completamente humanos. Por ejemplo, un método consiste en cribar una genoteca de linfocitos B humanos según el protocolo general esbozado por Huse *et al.*, Science 246:1275-1281 (1989). Se seleccionan anticuerpos que se unen a CS1 o un fragmento de los mismos. Las secuencias que codifican dichos anticuerpos (o los fragmentos de unión) se clonan entonces y se amplían. El protocolo descrito por Huse se vuelve más eficiente en combinación con la tecnología de presentación de fagos. Véase, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271 y McCafferty *et al.*, documento WO 92/01047; patente US nº 5.969.108. En estos procedimientos, se producen bancos de fagos en las que los miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos se uelen presentar como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos que presentan fagos con una especificidad deseada se seleccionan por enriquecimiento por afinidad a CS1 o a un fragmento de la misma.

Se pueden utilizar también ribosomas eucarióticos como medios para presentar un banco de anticuerpos y aislar los anticuerpos de unión humanos mediante cribado contra el antígeno diana, tal como CS1, como se describe en Coia G., *et al.*, J. Immunol. Methods 1:254 (1-2):191-7 (2001); Hanes J. *et al.*, Nat. Biotechnol. 18 (12):1287-92 (2000); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95 (24):14130-5 (1998); Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94 (10):4937-42 (1997).

El sistema de levadura también es adecuado para la detección de proteínas de la superficie celular de mamíferos o

segregadas, tales como anticuerpos. Los bancos de anticuerpos pueden presentarse en la superficie de células de levadura con objeto de obtener los anticuerpos humanos contra un antígeno diana. Este enfoque es descrito por Yeung, *et al.*, *Biotechnol. Prog.* 18(2):212-20 (2002); Boeder, E.T., *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 15(6):553-7 (1997). Alternativamente, los bancos de anticuerpos humanos pueden expresarse dentro de las células y cribarse por el de dos híbridos de levadura (documento WO 0200729A2).

Los fragmentos de los anticuerpos anti-CS1, que retienen la especificidad de unión a CS1, también se incluyen en la presente invención. Ejemplos de estos fragmentos de unión al antígeno incluyen, pero no se limitan a, cadenas pesadas parciales o completas o cadenas ligeras, regiones variables o las regiones CDR de los anticuerpos anti-CS1 descritos en la presente memoria.

En una forma de realización preferida de la descripción, los fragmentos de anticuerpos (fragmentos de unión a antígeno) son cadenas truncadas (truncadas en el extremo carboxilo). Preferentemente, estas cadenas truncadas poseen una o más actividades de inmunoglobulina (por ejemplo, actividad de fijación del complemento). Ejemplos de cadenas truncadas incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab (consistentes en los dominios VL, VH, CL y CH1); fragmentos Fd (consistentes en los dominios VH y CH1); fragmentos Fv (consistentes en los dominios VL y VH de una cadena simple de un anticuerpo); fragmentos dab (consistentes en un dominio VH); regiones CDR aisladas; fragmentos (Fab')₂, fragmentos bivalentes (que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra). Las cadenas truncadas se pueden producir por técnicas convencionales de bioquímica, tales como la escisión enzimática, o técnicas de ADN recombinante, cada una de las cuales es conocida en la técnica. Estos fragmentos polipeptídicos pueden producirse por escisión proteolítica de anticuerpos intactos por procedimientos bien conocidos en la técnica, o por inserción de codones de terminación en las posiciones deseadas en los vectores utilizando mutagenia dirigida, tal como después de CH1 para producir fragmentos Fab o después de la región bisagra para producir fragmentos (Fab')₂. Se pueden producir anticuerpos monocatenarios uniendo las regiones codificadoras V_L y V_H con un ADN que codifica un péptido enlazador que conecta los fragmentos de proteínas VL y VH.

Dado que los genes relacionados con la inmunoglobulina contienen regiones funcionales separadas, teniendo cada una una o más actividades biológicas distintas, los genes de los fragmentos de anticuerpos se pueden fusionar a regiones funcionales de otros genes (por ejemplo, enzimas, patente US nº 5.004.692) para producir proteínas de fusión (por ejemplo, inmunotoxinas) o conjugados que tienen nuevas propiedades.

Los anticuerpos utilizados en la presente descripción comprenden anticuerpos anti-CS1 en inmunotoxinas. Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos se han descrito extensamente en la técnica. Las toxinas pueden acoplarse a anticuerpos por técnicas de acoplamiento convencionales o las inmunotoxinas que contienen porciones de la toxina de proteínas pueden producirse como proteínas de fusión. Los conjugados de la presente invención se puede utilizar de un modo correspondiente para obtener dichas inmunotoxinas. Ejemplos ilustrativos de dichas inmunotoxinas son los descritos por Byers, B.S. *et al.*, *Seminars Cell Biol.* 2:59-70 (1991) y por Fanger, M.W. *et al.*, *Immunol Today* 12:51-54 (1991).

Se pueden utilizar técnicas de ADN recombinante para producir los anticuerpos anti-CS1 recombinantes, así como los anticuerpos anti-CS1 híbridos o humanizados o cualesquier otros anticuerpos anti-CS1 genéticamente alterados y fragmentos o conjugados de los mismos en algunos sistemas de expresión que incluyen sistemas de expresión tanto procarióticos como eucarióticos, tales como bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales y células de mamíferos (por ejemplo, células NSO).

Una vez producidos, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligeras y pesadas individuales u otras formas de inmunoglobulina de la presente invención pueden purificarse según los procedimientos habituales de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, en general, Scopes, R., *Protein Purification* (Springer-Verlag, Nueva York, 1982)). Se prefieren inmunoglobulinas sustancialmente puras de por lo menos aproximadamente 90 a 95% de homogeneidad, y las más preferidas tienen 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificadas, parcialmente o hasta homogeneidad según se desee, los polipéptidos pueden entonces utilizarse terapéuticamente (incluyendo fuera del cuerpo) o para desarrollar y realizar procedimientos de ensayo, tinciones inmunofluorescentes y similares. (Véase, en general, *Immunological Methods*, vols. I y II (Lefkovits y Pernis, eds., Academic Press, NY, 1979 y 1981). Los anticuerpos anti-CS1 aislados o purificados pueden cribarse más por su capacidad de neutralizar las actividades biológicas de CS1 como se describe en los Ejemplos.

Modelo de estructura de CS1

El marco de lectura abierto del gen CS1 humano (SEC. ID. nº 1) codifica un polipéptido de 335 restos de aminoácidos (SEC. ID. nº 2). La secuencia de proteína predicha tenía una secuencia supuesta del péptido señal y un dominio extracelular de alrededor de 225 restos de aminoácidos, seguido por un único dominio transmembranario de aproximadamente 25 restos de aminoácidos y un dominio intracelular de alrededor de 85 restos de aminoácidos. El dominio extracelular contenía siete puntos supuestos de glucosilación unidos por N. La homología de la secuencia de proteína predicha de CS1 indica que es un miembro de la superfamilia de Ig. La alineación de la secuencia de la

proteína CS1 indica una estructura similar con muchos restos conservados en comparación con otros receptores del subconjunto CD2. La región citoplásmica contiene dos de los nuevos motivos de tirosina observados en 2B4 y SLAM.

Un modelo de estructura del dominio extracelular de CS1 se prevé que consta de dos dominios de tipo inmunoglobulina. El dominio 1 en el terminal N (dominio V) es un miembro del subconjunto V, y dominio 2 (dominio C2) un miembro del subgrupo C2 de dominios de tipo inmunoglobulina, como en CD2 (código de PDB:1HNF). El dominio extracelular está unido en su extremo en el terminal C al dominio transmembranario que empieza en el resto aproximadamente 226 de aminoácidos.

En el dominio V (desde aproximadamente el resto 23 de aminoácidos hasta aproximadamente el resto 122 de aminoácidos), se conserva Trp-53 en el núcleo del dominio, y todos los restos en proximidad inmediata son idénticos a los de CD2 (Leu-90 y Val -105) o se sustituyen de forma conservadora (Tyr-120 para Phe en CD2). Como en CD2, no hay puente disulfuro dentro del dominio en el dominio V. En el dominio C2 (desde aproximadamente el resto de aminoácido 128 hasta aproximadamente el resto aminoácido 225), se conservan los dos enlaces de disulfuro dentro del dominio (Cys-151-Cys-195; Cys-145-Cys 215), y todos los restos en proximidad inmediata de la primera, en el núcleo del dominio, bien son idénticos a los de CD2 (Pro-131) o están sustituidos de forma conservadora (Val-133, Ile-161, Leu-180 en CS1, por Ile, Leu e Ile, respectivamente, en CD2). La región del enlazador entre dominios (desde aproximadamente el resto 123 de aminoácido hasta aproximadamente el resto 127 de aminoácido) tiene también idéntica longitud entre CS1 y CD2 y muestra algo de conservación (Val-Tyr-Glu-His-Leu en CS1 frente a Ile-Gln-Glu-Arg-Val en CD2).

Hay siete puntos potenciales de glucosilación unidos por N, dos en el dominio V (Asn-56 y Asn-98), y cinco en dominio C2 (Asn-142, Asn-148, Asn-172, Asn-176 y Asn-204).

La similitud estructural en el contexto de las secuencias y motivos entre CS1 y las proteínas definidas por antígenos CD sugiere que las proteínas CS1 puede ser un objetivo potencial para las enfermedades tales como la inflamación, el cáncer y los trastornos inmunitarios. Las utilizaciones terapéuticas de anticuerpos anti-CS1, tales como anticuerpos Luc, incluyen la inhibición de la producción de inmunoglobulinas, la inhibición de la función de los leucocitos en enfermedades autoinmunitarias y en los cánceres que expresan proteínas CS1.

Utilización de ácidos nucleicos de CS1

Como se ha descrito anteriormente, las secuencias de CS1 se identificaron inicialmente por homología de secuencia sustancial de ácido nucleico y/o de aminoácidos o enlace con las secuencias de CS1 de la Tabla 2. Dicha homología puede basarse en la secuencia completa de ácido nucleico o de aminoácidos, y se determina generalmente utilizando programas de homología o condiciones de hibridación. Por lo general, las secuencias enlazadas en un ARNm se encuentran en la misma molécula.

El porcentaje de identidad de una secuencia se puede determinar utilizando un algoritmo tal como BLAST. Un método preferido utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 ajustado a los parámetros por defecto, con tramo de solapamiento y fracción de solapamiento ajustados a 1 y 0,125, respectivamente. La alineación puede incluir la introducción de huecos en las secuencias que deben alinearse. Además, para las secuencias de nucleótidos que contienen más o menos nucleótidos que las de los ácidos nucleicos descritos, el porcentaje de homología puede determinarse basándose en el número de nucleósidos homólogos en relación con el número total de nucleósidos. Así, por ejemplo, la homología de secuencias más cortas que las de las secuencias identificadas se determinará utilizando el número de nucleósidos en la secuencia más corta.

En una forma de realización, la homología de ácido nucleico se determina mediante estudios de hibridación. Así, por ejemplo, los ácidos nucleicos que se hibridan en alta severidad a un ácido nucleico descrito, o a su complemento, o se encuentra también en los ARNm de origen natural se considera una secuencia homóloga. En otra forma de realización, se utiliza condiciones de hibridación menos estrictas; por ejemplo, se pueden utilizar condiciones de severidad moderadas o bajas, véase Ausubel, más arriba, y Tijssen, más arriba.

Las secuencias de ácidos nucleicos de CS1 de la descripción, por ejemplo, las secuencias de la Tabla 2, pueden ser fragmentos de genes mayores, por ejemplo, son segmentos de ácidos nucleicos. "Genes" en este contexto incluye las regiones codificadoras, regiones no codificadoras, y mezclas de regiones codificadoras y no codificadoras. Por consiguiente, utilizando las secuencias proporcionadas en la presente memoria, secuencias ampliadas, en cualquier dirección, de los genes de CS1 se pueden obtener, utilizando técnicas bien conocidas para la clonación o bien secuencias más largas o las secuencias completas, véase Ausubel, *et al.*, más arriba. Se puede hacer mucho por informática y muchas secuencias pueden agruparse para que incluyan muchas secuencias correspondientes a un solo gen, por ejemplo, sistemas tal como UniGene.

Los ácidos nucleicos de CS1 de la presente descripción se utilizan de varias maneras. En una forma de realización, las sondas de ácidos nucleicos para CS1 se preparan y se acoplan a biochips para utilizarse en métodos de detección y de diagnóstico, como los esbozados a continuación, o para la administración, por ejemplo, para terapia

génica, vacunas, ARNi, y/o aplicaciones en la cadena complementaria. Alternativamente, los ácidos nucleicos de CS1 que incluyen regiones codificadoras de la proteína CS1 se pueden colocar en vectores de expresión para la expresión de la proteína CS1, de nuevo con fines de detección o para la administración a un paciente.

En otra forma de realización, se preparan sondas de ácidos nucleicos para el ácido nucleico CS1 (tanto las secuencias de ácidos nucleicos esbozadas en las figuras y/o los complementos de las mismas). Las sondas de ácido nucleico acopladas al biochip se diseñan para ser sustancialmente complementarias con el ácido nucleico de CS1, por ejemplo, la secuencia objetivo (ya sea la secuencia diana de la muestra o a otras secuencias de sondas, por ejemplo, en ensayos intercalados), de tal manera que se produce la hibridación de la secuencia diana y las sondas de la presente invención. Como se esboza a continuación, esta complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber cualquier número de incompatibilidades de pares de bases que interfieran con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios de la presente descripción. Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no puede ocurrir ninguna hibridación incluso en las condiciones de hibridación menos severas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. Por lo tanto, por "sustancialmente complementaria" se entiende en la presente memoria que las sondas son suficientemente complementarias para que las secuencias diana se hibriden en condiciones normales de reacción, particularmente en condiciones de alta severidad, como se esboza en la presente memoria.

Una sonda de ácido nucleico es generalmente monocatenaria, pero puede ser en parte monocatenaria y en parte bicatenaria. El número de cadenas de la sonda viene impuesto por la estructura, composición y propiedades de la secuencia diana. En general, las sondas de ácidos nucleicos varían entre aproximadamente 8 y 100 bases de longitud, prefiriéndose aproximadamente de 10 a 80 bases, y prefiriéndose especialmente aproximadamente de 30 a 50 bases. Es decir, generalmente no se utilizan genes enteros. En algunas formas de realización, se pueden utilizar ácidos nucleicos mucho más largos, de hasta centenares de bases.

En otra forma de realización, se utiliza más de una sonda por secuencia, ya sea con sondas de superposición o sondas para diferentes secciones de la diana que se utiliza. Es decir, dos, tres, cuatro o más sondas, prefiriéndose tres, se utilizan para construir en una redundancia para una diana específica. Las sondas pueden superponerse (por ejemplo, tener alguna secuencia en común), o diferenciarse. En algunos casos, pueden utilizarse cebadores de RCP para ampliar la señal para una mayor sensibilidad.

Los ácidos nucleicos se pueden unir o inmovilizar a un soporte sólido en una amplia variedad de formas. Por "inmovilizado" y equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende la asociación o enlace entre la sonda de ácido nucleico y el soporte sólido es suficiente para ser estable en las condiciones de de enlace, lavado, análisis y eliminación tal como se indica. El enlace puede ser por lo general covalente o no covalente. Por "enlace no covalente" y equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende una o más de las interacciones electrostáticas, hidrófilas, e hidrófobas. En enlace no covalente se incluye el acoplamiento covalente de una molécula, por ejemplo estreptavidina al soporte y el enlace no covalente de la sonda biotinilada a la estreptavidina. Por "enlace covalente" y equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende que los dos restos, el soporte sólido y la sonda, están unidos por al menos un enlace, incluyendo enlaces sigma, enlaces pi, y enlaces de coordinación. Los enlaces covalentes pueden formarse directamente entre la sonda y el soporte sólido o pueden formarse por un agente de reticulación o por inclusión de un grupo reactivo específico ya sea en el soporte sólido o la sonda o ambas moléculas. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalentes y no covalentes.

En general, las sondas están unidas al biochip en una amplia variedad de formas. Como se describe en la presente memoria, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse en primer lugar, con posterior acoplamiento al biochip, o pueden sintetizarse directamente sobre el biochip.

El biochip comprende un sustrato sólido adecuado. Por "sustrato" o "soporte sólido" u otros equivalentes gramaticales en la presente memoria se entiende un material que puede modificarse para el acoplamiento o asociación de las sondas de ácidos nucleicos y es susceptible de por lo menos un método de detección. A menudo, el sustrato puede contener puntos individuales distintos apropiados para la división individual y la identificación. El número de sustratos posibles es muy grande, e incluyen, pero no se limitan a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibuteno, poliuretanos, Teflón, etc.), polisacáridos, nilón o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice incluyendo el silicio y el silicio modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, etc. En general, los sustratos permiten la detección óptica y no fluoresce de forma apreciable. Véase el documento WO 0055627.

Generalmente el sustrato es plano, aunque también se pueden utilizar otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas se pueden colocar en la superficie interior de un tubo para el análisis de muestras flujo a través para minimizar el volumen de muestra. Del mismo modo, el sustrato puede ser flexible, tal como una espuma flexible, que incluye espumas de celdas cerradas de plásticos específicos.

En una forma de realización, la superficie del biochip y la sonda pueden modificarse con grupos químicos

funcionales para el acoplamiento posterior de los dos. Así, por ejemplo, el biochip se modifica con un grupo químico funcional que incluye, pero no se limita a, grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo y grupos tiol, prefiriéndose particularmente los grupos amino. Utilizando estos grupos funcionales, las sondas pueden acoplarse utilizando grupos funcionales en las sondas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen grupos amino pueden acoplarse a superficies que contienen grupos amino, por ejemplo, utilizando enlazadores; por ejemplo, enlazadores homo- o hetero-bifuncionales que son bien conocidos (véase catálogo de Pierce Chemical Company de 1994, la sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200). Además, en algunos casos, pueden utilizarse enlazadores adicionales, tales como los grupos alquilo (incluidos los grupos heteroalquilo y sustituidos).

En esta forma de realización, se sintetizan oligonucleótidos, y a continuación se acoplan a la superficie del soporte sólido. Uno de los terminales 5' o 3' puede acoplarse al soporte sólido, o el acoplamiento puede ser por enlace a un nucleósido interno. En otra forma de realización, la inmovilización al soporte sólido puede ser muy fuerte, aunque no covalente. Por ejemplo, pueden prepararse oligonucleótidos biotinilados, que se unen a superficies recubiertas por enlace covalente con estreptavidina, dando como resultado el acoplamiento.

Alternativamente, los oligonucleótidos pueden sintetizarse en la superficie. Por ejemplo, se utilizan técnicas de fotoactivación que utilizan compuestos y técnicas de fotopolimerización. En otra forma de realización, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse *in situ*, utilizando técnicas fotolitográficas conocidas, tales como las descritos en los documentos WO 95/25116; WO 95/35505; patentes US nº 5.700.637y nº 5.445.934; y las referencias citadas en estos procedimientos de acoplamiento forman la base de la tecnología Affymetrix GENECHIP® (Chip de ADN).

A menudo, se realizan ensayos basados en la ampliación para medir el nivel de expresión de secuencias asociadas a CS1. Estos ensayos se realizan normalmente juntamente con la transcripción inversa. En dichos ensayos, una secuencia de ácido nucleico asociado a CS1 actúa como plantilla en una reacción de ampliación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa, o RCP). En una ampliación cuantitativa, la cantidad de producto de ampliación será proporcional a la cantidad de plantilla en la muestra original. La comparación con las referencias apropiadas proporciona una medida de la cantidad de ARN asociado a CS1. Los métodos de ampliación cuantitativa son bien conocidos. Los protocolos detallados para RCP cuantitativa se proporcionan, por ejemplo, en Innis, *et al.* (1990) RCP Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press.

En algunas formas de realización, para medir la expresión se utiliza un ensayo basado en TAQMAN® (sonda de oligonucleótido fluorógena). Los ensayos basados en TAQMAN® utilizan una sonda de oligonucleótidos fluorógena que contiene un colorante fluorescente en 5' y agente de extinción en 3'. La sonda se hibrida a un producto de RCP, pero no puede ampliarse debido a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando el producto de la RCP se amplía en ciclos posteriores, la actividad de 5' nucleasa de la polimerasa, por ejemplo, AMPLITAQ® (ADN polimerasa), da como resultado la escisión de la sonda TAQMAN®. Esta escisión separa el colorante fluorescente en 5' y el agente de extinción en 3', con lo que se produce un aumento de la fluorescencia en función de la ampliación (véase, por ejemplo, la bibliografía proporcionada por Perkin-Elmer).

Otros procedimientos de ampliación adecuados incluyen, pero no se limitan a, la reacción en cadena de la ligasa (LCR) (véase Wu y Wallace (1959) Genomics 4:560-569, Landegren, *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080, y Barringer, *et al.* (1990) *Gene* 89:117-122), la ampliación de la transcripción (Kwoh, *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:1173-1177), la replicación auto-mantenida de secuencias (Guatelli, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 87:1874-1878), RCP de manchas, enlazador adaptador de RCP, etc.

Expresión de la proteína CS1 a partir de ácidos nucleicos

En una forma de realización, el ácido nucleico CS1, por ejemplo, que codifica la proteína CS1, se utiliza para preparar una variedad de vectores de expresión para expresar la proteína CS1 que se puede utilizar a continuación en los reactivos de revelado para los ensayos de diagnóstico como se describe a continuación. Los vectores de expresión y la tecnología de ADN recombinante son bien conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, más arriba, y Fernández y Hoeffler (eds. 1999) *Gene Expression Systems* Academic Press) para expresar proteínas. Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos auto-replicantes o vectores que se integran en un genoma hospedador. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen ácido nucleico regulador de transcripción y traducción unido operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína CS1. La expresión "secuencias de referencia" se refiere a secuencias de ADN utilizadas para la expresión de una secuencia codificadora unida operativamente en un organismo hospedador concreto. Las secuencias de referencia que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un activador, opcionalmente una secuencia de operador, y un punto de unión al ribosoma. Las células eucarióticas son conocidas por utilizar activadores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "operativamente unido" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o un secretor principal está operativamente unido al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un activador o potenciador está operativamente unido a una secuencia codificadora si afecta a la transcripción de la secuencia; o un punto de unión al ribosoma está operativamente unido a una secuencia codificadora si está

colocado de modo que facilite la traducción. Generalmente, "operativamente unido" significa que las secuencias de ADN que están unidas están contiguas, y, en el caso de un secroter principal, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que estar contiguos. El enlace se suele realizar mediante ligadura en secuencias de restricción convenientes. Si dichas secuencias no existen, se utilizan adaptadores o enlazadores de oligonucleótidos sintéticos según la práctica habitual. El ácido nucleico regulador de la transcripción y traducción será generalmente apropiado para la célula hospedadora utilizada para expresar la proteína CS1. Numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y de secuencias reguladoras adecuadas son conocidos por una variedad de células hospedadoras.

En general, las secuencias reguladoras de la transcripción y de la traducción pueden incluir, pero no se limitan a, secuencias activadoras, puntos de unión al ribosoma, secuencias de inicio y terminación de la transcripción, secuencias de inicio y terminación de la traducción y secuencias potenciadoras o activadoras. En una forma de realización, las secuencias reguladoras incluyen un activador y secuencias de inicio y de terminación de la transcripción.

Las secuencias activadoras pueden ser tanto activadores constitutivos o inducibles. Los activadores pueden ser bien activadores de origen natural o activadores híbridos. Los activadores híbridos, que combinan elementos de más de un activador, también son conocidos, y son útiles en la presente invención.

Un vector de expresión puede comprender otros elementos. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiéndole de este modo mantenerse en dos organismos, por ejemplo, en células de mamíferos o insectos para la expresión y en un hospedador procariótico para clonación y ampliación. Además, para integrar vectores de expresión, el vector de expresión a menudo contiene por lo menos una secuencia homóloga al genoma de la célula hospedadora, y preferentemente dos secuencias homólogas que flanquean el montaje de expresión. El vector de integración puede dirigirse a un locus específico en la célula hospedadora seleccionando la secuencia homóloga apropiada para inclusión en el vector. Las construcciones para integrar vectores están disponibles. Véase, por ejemplo, Fernández y Hoeffler, más arriba; y Kitamura, *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA.* 92:9146-9150.

Además, en otra forma de realización, el vector de expresión contiene un gen marcador seleccionable para permitir la selección de células hospedadoras transformadas. Los genes de selección son bien conocidos y pueden variar con la célula hospedadora utilizada.

La proteína CS1 de la presente descripción se producen generalmente cultivando una célula hospedadora transformada con un vector de expresión que contiene ácido nucleico que codifica una proteína CS1, en condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína CS1. Las condiciones apropiadas para la expresión de proteínas CS1 variará con la elección del vector de expresión y la célula hospedadora, y se determinarán fácilmente por experimentación de rutina u optimización. Por ejemplo, la utilización de activadores constitutivos en el vector de expresión requerirá optimizar el crecimiento y la proliferación de la célula hospedadora, mientras que la utilización de un activador inducible requiere condiciones de crecimiento apropiadas para la inducción. Además, en algunas formas de realización, el momento de la cosecha es importante. Por ejemplo, los sistemas de baculovirus utilizados en la expresión de células de insecto son virus líticos, y por lo tanto de selección de tiempo de la cosecha puede ser crucial para el rendimiento del producto.

Las células hospedadoras apropiadas incluyen levaduras, bacterias, arqueobacterias, hongos y células de insectos y animales, incluyendo células de mamíferos. Son de especial interés *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, células Sf9, células C129, células 293, células de Neurospora, BHK, CHO, COS, HeLa, HUVEC (células endoteliales humanas de la vena umbilical), células THP1 (una estirpe celular de macrófagos) y varias otras células y estirpes celulares humanas.

En una forma de realización, las proteínas CS1 se expresan en células de mamífero. Se pueden utilizar sistemas de expresión de mamíferos, e incluyen sistemas retrovíricos y adenovíricos. Un sistema de vector de expresión es un sistema de vector retrovírico como se describe generalmente en PCT/US97/01019 y PCT/US97/01048. Los activadores de genes víricos de mamíferos son de uso específico como activadores de mamíferos, ya que los genes víricos son a menudo muy expresados y tienen una amplia gama de hospedadores. Los ejemplos incluyen el activador inicial de SV40, el activador LTR del virus del tumor de mama de ratón, el activador tardío principal de adenovirus, activador del virus del herpes simple, y el activador de CMV (véase, por ejemplo, Fernández y Hoeffler, más arriba). Por lo general, la terminación de la transcripción y las secuencias de poliadenilación reconocidas por células de mamífero son regiones reguladoras situadas en 3' del codón de terminación de la traducción y por lo tanto, junto con los elementos activadores, flanquean la secuencia codificadora. Los ejemplos de terminador de la transcripción y señales de poliadenilación incluyen los derivados de SV40.

Los procedimientos para introducir ácido nucleico exógeno en hospedadores mamíferos, así como otros hospedadores, están disponibles, y variarán con las células hospedadoras utilizadas. Las técnicas incluyen la transfección en la que interviene dextrano, la precipitación con fosfato de calcio, transfección en la que interviene polibreno, la fusión de protoplastos, la electroporación, la infección vírica, la encapsulación de polinucleótido(s) en

liposomas y la microinyección directa del ADN en los núcleos.

En otra forma de realización, la proteína CS1 se expresa en sistemas bacterianos. También pueden utilizarse activadores de bacteriófagos. Además, también son útiles los activadores sintéticos y los activadores híbridos; por ejemplo, el activador tac es un híbrido de las secuencias activadoras trp y lac. Además, un activador bacteriano puede incluir activadores naturales de origen no bacteriano que tienen capacidad de unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Además de una secuencia activadora de funcionamiento, es deseable un punto de unión al ribosoma eficaz. El vector de expresión puede incluir también una secuencia de péptido señal que proporciona la secreción de la proteína CS1 en bacterias. La proteína se segrega en el medio de crecimiento (bacterias Gram positivas) o en el espacio periplásmico, situado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gram-negativas). El vector de expresión bacteriano también puede incluir un gen marcador seleccionable para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Genes de selección adecuados incluyen genes que hacen resistentes a las bacterias a fármacos tales como ampicilina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina y tetraciclina. Los marcadores seleccionables también incluyen genes biosintéticos, tales como los de la histidina, triptófano, leucina y rutas de biosíntesis. Estos componentes se ensamblan en vectores de expresión. Los vectores de expresión para bacterias son bien conocidos, e incluyen vectores para *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris* y *Streptococcus lividans*, entre otros (por ejemplo, Fernández y Hoeffler, citado anteriormente). Los vectores de expresión bacterianos se transforman en células hospedadoras bacterianas utilizando técnicas tales como el tratamiento con cloruro de calcio, electroporación, y otras.

En una forma de realización, la proteína CS1 se produce en células de insecto utilizando, por ejemplo, vectores de expresión para la transformación de células de insecto, y en particular, los vectores de expresión basados en baculovirus.

En otra forma de realización, una proteína CS1 se produce en células de levadura. Sistemas de expresión de levaduras son bien conocidos, e incluyen vectores de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guilliermondii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*.

La proteína CS1 también se puede preparar como una proteína de fusión, utilizando técnicas disponibles. Así, por ejemplo, para la creación de anticuerpos monoclonales, si el epítipo deseado es pequeño, la proteína CS1 se puede fusionar a una proteína portadora para formar un inmunógeno. Alternativamente, la proteína CS1 se puede preparar como una proteína de fusión para aumentar la expresión, o por otras razones. Por ejemplo, cuando la proteína CS1 es un péptido CS1, el ácido nucleico que codifica el péptido puede estar unido a otro ácido nucleico para la expresión. La fusión puede realizarse con etiquetas de epítipo de detección, por ejemplo, con FLAG, His6, myc, HA, etc.

Aún en otra forma de realización, la proteína CS1 se purifica o aísla después de la expresión. La proteína CS1 puede aislarse o purificarse de varias maneras, dependiendo de qué otros componentes están presentes en la muestra y los requisitos para el producto purificado, por ejemplo, configuración natural o desnaturalizado. Los procedimientos estándar de purificación incluyen precipitación con sulfato amónico, técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas y cromatográficas, incluyendo el intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, de afinidad y HPLC de fase inversa y cromatofocalización. Por ejemplo, la proteína CS1 se puede purificar utilizando una columna normal con anticuerpo de proteína anti-CS1. Técnicas de ultrafiltración y diafiltración, junto con concentración de proteínas, son también útiles. Véase, por ejemplo, Walsh (2002) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology* Wiley; Hardin, *et al.* (eds. 2001) *Cloning, Gene Expression and Protein Purification* Oxford Univ. Press; Wilson, *et al.* (eds. 2000) *Encyclopedia of Separation Science* Academic Press; y Scopes (1993) *Protein Purification* Springer-Verlag. El grado de purificación necesario variará dependiendo de la utilización de la proteína CS1. En algunos casos no será necesaria purificación.

Una vez expresadas y purificadas, si es necesario, las proteínas CS1 y los ácidos nucleicos son útiles en numerosas aplicaciones. Pueden utilizarse como reactivos de inmunoselección, como reactivos de vacunas, como agentes de detección, entidades terapéuticas, para la producción de anticuerpos, como inhibidores de transcripción o traducción, etc.

Variantes de proteínas CS1

También están incluidas dentro de una forma de realización de las proteínas CS1 las variantes de aminoácidos de las secuencias de origen natural, determinadas en la presente memoria. Preferentemente, las variantes son preferentemente superiores a aproximadamente 75% homólogas a la secuencia natural, más preferentemente superiores a aproximadamente 80%, aún más preferentemente superiores a aproximadamente 85%, y más preferentemente superiores a 90%. En algunas formas de realización, la homología será tan grande como aproximadamente del 93 al 95% o 98%. En cuanto a los ácidos nucleicos, homología en este contexto significa similitud o identidad de secuencia, prefiriéndose identidad. Esta homología se determinará utilizando técnicas habituales, como las esbozadas anteriormente para homologías de ácidos nucleicos.

La Proteína CS1 de la presente descripción puede ser más corta o más larga que las secuencias de aminoácidos naturales. Por lo tanto, dentro de la definición de proteínas CS1 están incluidas porciones o fragmentos de las secuencias naturales en la presente memoria. Además, como se esbozó anteriormente, el ácido nucleico CS1 de la invención puede utilizarse para obtener otras regiones codificadoras, y por lo tanto otra secuencia de proteínas.

En una forma de realización, las proteínas CS1 son derivados o variantes de proteínas CS1, en comparación con la secuencia natural. Es decir, como se esboza con más detalle a continuación, el derivado del péptido CS1 a menudo contendrá al menos una sustitución, supresión, o inserción de aminoácidos, prefiriéndose particularmente las sustituciones de aminoácidos. La sustitución, inserción o eliminación de aminoácidos puede ocurrir en muchas posiciones de restos en el péptido CS1.

También están incluidas dentro de una forma de realización de proteínas CS1 de la presente descripción las variantes de secuencias de aminoácidos. Estas variantes por lo general caen dentro de una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o eliminación. Estas variantes ordinariamente se preparan por mutagenia específica de nucleótidos en el ADN que codifica la proteína CS1, utilizando mutagenia por inserción de casete o RCP u otras técnicas, para producir ADN que codifica la variante, y después expresar el ADN en cultivo celular recombinante como se indicó anteriormente. Sin embargo, la variante de fragmentos de proteína CS1 que tiene hasta aproximadamente 100 a 150 restos puede prepararse por síntesis *in vitro* utilizando técnicas demostradas. Las variantes de secuencias de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la variación, una característica que los distingue de la variación alélica o interespecies natural de la secuencia de aminoácidos de la proteína CS1. Las variantes suelen presentar una actividad biológica cualitativa similar a la de un análogo natural, aunque también se pueden seleccionar variantes que han modificado características.

Mientras que el sitio o región para introducir una variación de la secuencia de aminoácidos está a menudo predeterminado, la mutación de por sí no necesita estar predeterminada. Por ejemplo, para optimizar el rendimiento de una mutación en un sitio dado, la mutagenia al azar se puede realizar en el codón o región diana y detectar las variantes de CS1 expresadas para la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para preparar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN con una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo, la mutagenia con cebador M13 y la mutagenia por RCP. La detección de mutantes con frecuencia se hace utilizando ensayos de actividades de proteínas CS1.

Las sustituciones de aminoácidos son por lo general de restos aislados; las inserciones normalmente serán del orden de aproximadamente 1 a 20 aminoácidos, aunque inserciones pueden tolerarse considerablemente mayores. Las eliminaciones oscilarán generalmente de aproximadamente 1 a 20 restos, aunque en algunos casos las eliminaciones pueden ser mucho mayores.

Pueden utilizarse sustituciones, eliminaciones, inserciones o combinaciones de los mismos para llegar a un derivado final. Generalmente estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, pueden tolerarse cambios mayores en determinadas circunstancias. Cuando se desean pequeñas alteraciones en las características de la proteína CS1, las sustituciones se hacen generalmente según las relaciones de sustitución de aminoácidos descritas.

Las variantes suelen presentar esencialmente la misma actividad biológica cualitativa y provocarán la misma respuesta inmunitaria que un análogo de origen natural, aunque las variantes también se seleccionan para modificar las características de las proteínas CS1, según sea necesario. Alternativamente, la variante puede diseñarse de tal manera que se altere una actividad biológica de la proteína CS1. Por ejemplo, pueden añadirse, alterarse o eliminarse sitios de glucosilación.

A veces se realizan cambios sustanciales en la función o identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservadoras que las descritas anteriormente. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones que afectan más significativamente: la estructura del eje central del polipéptido en el área de la alteración, por ejemplo la estructura de hélice alfa o lámina beta; la carga o hidrofobia de la molécula en el punto diana, o la mayor parte de la cadena lateral. Las sustituciones que en general son de esperar que produzcan los mayores cambios en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo, serina o treonina se sustituye por (o mediante) un resto hidrófobo, por ejemplo, leucina, isoleucina, fenilalanina, valina o alanina; (b) una cisteína o prolina se sustituye por (o mediante) otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, se sustituye por (o mediante) un resto electronegativo, por ejemplo, ácido glutámico o aspártico; (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo, fenilalanina, se sustituye por (o mediante) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo, glicina, o (e) un resto de prolina se incorpora o sustituye, que cambia el grado de libertad de rotación del enlace peptídico.

Las variantes suelen presentar una actividad biológica cualitativa similar y provocarán la misma respuesta inmunitaria como el análogo de origen natural, aunque las variantes también se seleccionan para modificar las características de las proteínas de la piel CS1, según se necesite. Alternativamente, la variante puede diseñarse de tal manera que se altera la actividad biológica de la proteína CS1. Por ejemplo, pueden añadirse, alterarse o suprimirse sitios de glucosilación.

Las modificaciones covalentes de polipéptidos CS1 están incluidas dentro del alcance de la presente invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos destinatarios de un polipéptido CS1 con un agente de modificación orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos de los terminales N o C de un polipéptido CS1. La modificación con agentes bifuncionales es útil, por ejemplo, para la reticulación de polipéptidos CS1 a una matriz con soporte insoluble en agua o la superficie para su utilización en un procedimiento para purificar anticuerpos anti-CS1 de polipéptidos o ensayos de detección, como se describe más detalladamente a continuación. Los agentes de reticulación comúnmente utilizados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano y agentes tales como metil-3-((p-azidofenil)ditio)propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutaminilo y asparaginilo a los correspondientes restos glutamilo y aspartilo, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos serinilo, treonilo o tirosilo, la metilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (por ejemplo, págs. 79-86, Creighton (1992) *Proteins: Structure and Molecular Properties* Freeman), la acetilación de la amina del terminal N y la amidación de un grupo carboxilo del terminal C.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido CS1 comprende alterar el patrón de glucosilación natural del polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación natural" quiere decir en la presente memoria suprimir uno o más restos de carbohidratos encontrados en el polipéptido CS1 de la secuencia natural, y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el polipéptido CS1 de la secuencia natural. Los patrones de glucosilación pueden alterarse de muchas maneras. Diferentes tipos de células para expresar secuencias asociadas a CS1 pueden dar lugar a diferentes patrones de glucosilación.

La adición de sitios de glucosilación a polipéptidos CS1 también se puede llevar a cabo alterando la secuencia de aminoácidos de los mismos. La alteración puede hacerse, por ejemplo, mediante la adición de, o la sustitución por, uno o más restos de serina o treonina al polipéptido CS1 de la secuencia natural (para sitios de glucosilación unidos a O). La secuencia de aminoácidos de CS1 puede alterarse opcionalmente por cambios a nivel de ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido CS1 en bases preseleccionadas de modo que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

Otro medio de aumentar el número de restos carbohidrato en el polipéptido CS1 es por acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 87/05330; págs. 259-306 en Aplin y Wriston (1981) *CRC Crit. Rev. Biochem.*

La eliminación de restos de carbohidrato presentes en el polipéptido CS1 podría llevarse a cabo por vía química o enzimática o por sustitución mutágena de codones que codifican restos aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Se pueden aplicar técnicas de desglucosilación química. Véase, por ejemplo, Sojar y Bahl (1987) *Arch. Biochem. Biophys.* 259:52-57 y Edge, et al. (1981) *Anal. Biochem.* 118:131-137. El corte enzimático de restos de carbohidratos en polipéptidos puede conseguirse mediante la utilización de una variedad de endo-y exoglucosidasas. Véase, por ejemplo, Thotakura, et al. (1987) *Meth. Enzymol.* 138:350-359.

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos CS1 comprende unir el polipéptido CS1 a uno de una variedad de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol o polioxialquilenos, de la manera descrita en las patentes US nº 4.640.835; nº 4.496.689; nº 4.301.144; nº 4.670.417; nº 4.791.192 o nº 4.179.337.

Los polipéptidos CS1 de la presente descripción también se pueden modificar de una manera para formar moléculas híbridas que comprenden un polipéptido CS1 fusionada a otra secuencia heteróloga de ácido polipéptido o amino. En una forma de realización, dicha molécula híbrida comprende una fusión de un polipéptido CS1 con un polipéptido con etiqueta que proporciona un epítipo al que un anticuerpo anti-etiqueta puede unirse selectivamente. La etiqueta del epítipo se coloca generalmente en el terminal amino o carboxilo del polipéptido CS1. La presencia de tales formas etiquetadas de epítipo de un polipéptido CS1 se puede detectar utilizando un anticuerpo contra el polipéptido con etiqueta. También, el suministro de la etiqueta del epítipo permite que el polipéptido CS1 se purifique fácilmente por purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-etiqueta u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta del epítipo. En una forma de realización alternativa, la molécula híbrida puede comprender una fusión de un polipéptido CS1 con una inmunoglobulina o una región específica de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula híbrida, dicha fusión podría ser a la región Fc de una molécula de IgG.

Se dispone de varios polipéptidos con etiqueta y sus respectivos anticuerpos. Los ejemplos incluyen poli-histidina (poly-his) o poli-histidina-glicina (poly-his-gly); HIS6 y etiquetas de quelación de metales, el polipéptido con etiqueta HA de la gripe y su anticuerpo 12CA5 (Field, et al. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8:2159-2165); la etiqueta c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 y 9E10 para la misma (Evan, et al. (1985) *Molecular and Cellular Biology* 5:3610-3616); y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky, et al.

(1990) *Protein Engineering* 3 (6):547-553). Otros polipéptidos con etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp, *et al.* (1988) *BioTechnology* 6:1204-1210); el péptido epítipo KT3 (Martin, *et al.* (1992) *Science* 255:192-194); epítipo peptídico de tubulina (Skinner, *et al.* (1991) *J. Biol. Chem.* 266:15163-15166); y la etiqueta peptídica de la proteína 10 del gen T7 (Lutz-Freyermuth, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:6393-6397).

También se incluyen las proteínas CS1 de otros organismos, tales como del chimpancé, macaco cangrejero y macaco rhesus, que se clonan y se expresan como se esboza a continuación. Por lo tanto, se pueden utilizar sondas o secuencias de cebadores de reacción en cadena de la polimerasa (RCP) degeneradas para encontrar otras proteínas CS1 relacionadas de seres humanos u otros organismos. Sondas particularmente útiles y/o secuencias de cebadores de RCP incluyen las áreas únicas de la secuencia de ácido nucleico CS1. Cebadores de RCP preferidos son de aproximadamente 15 a 35 nucleótidos de longitud, prefiriéndose desde aproximadamente de 20 a 30, y pueden contener inosina según sea necesario. Las condiciones para la reacción RCP han sido bien descritas (por ejemplo, Innis, RCP Protocols, más arriba).

Además se incluyen proteínas híbridas CS1 construidas para contener segmentos de aminoácidos de diferentes organismos. Por ejemplo, las proteínas CS1 híbridas se construyen por fusión de los aminoácidos 1 a 67 de CS1 humana a los aminoácidos 68 a 224 de CS1 de ratón, o alternativamente fusionando los aminoácidos 1 a 151 de CS1 humana a los aminoácidos 149 a 224 de CS1 de ratón, o además alternativamente fusionando los aminoácidos 1 a 169 de CS1 humana a los aminoácidos 167 a 224 de CS1 de ratón. Al contrario, las proteínas CS1 híbridas se construyen también fusionando los aminoácidos 1 a 67 de CS1 de ratón a los aminoácidos 68 a 227 de CS1 humana, o alternativamente, fusionando los aminoácidos 1 a 131 de CS1 de ratón a los aminoácidos 135 a 227 de CS1 humana, o además alternativamente fusionando los aminoácidos 1 a 166 de CS1 de ratón a los aminoácidos 170 a 227 de CS1 humana.

Además, pueden prepararse proteínas CS1 que son más largas que las codificadas por los ácidos nucleicos de la Tabla 2, por ejemplo, mediante el esclarecimiento de secuencias ampliadas, la adición de marcadores de epítipo o purificación, la adición de otras secuencias de fusión, etc.

Las proteínas CS1 también pueden identificarse porque son codificadas por ácidos nucleicos CS1. Así pues, las proteínas CS1 son codificados por ácidos nucleicos que se hibridan con las secuencias de los listados de secuencias, o sus complementos, como se esboza en la presente memoria.

Parejas de unión a proteínas CS1

Anticuerpos CS1

Los anticuerpos CS1 de la invención se unen específicamente a proteínas CS1. Por "se unen específicamente" en la presente memoria se entiende que los anticuerpos se unen a la proteína con una K_d de por lo menos aproximadamente 0,1 mM, más habitualmente por lo menos aproximadamente 1 μ M, preferentemente de por lo menos aproximadamente 0,1 μ M o mejor, y más preferentemente, de 0,01 μ M o mejor. La selectividad de unión a la diana específica y no a las secuencias relacionadas a menudo también es importante.

En una forma de realización, cuando la proteína CS1 se va a utilizar para generar parejas de unión, por ejemplo, anticuerpos para inmunodiagnóstico, la proteína CS1 deben compartir al menos un epítipo o determinante con la proteína completa. Por "epítipo" o "determinante" en la presente memoria por lo general se entiende una porción de una proteína que generará y/o se unirá a un anticuerpo o a un receptor de linfocitos T en el contexto de MHC. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, los anticuerpos hacen que una proteína CS1 más pequeña sea capaz de unirse a la proteína completa, particularmente epítipos lineales. En otra forma de realización, el epítipo es único, es decir, los anticuerpos generados contra un único epítipo muestran poca o ninguna reactividad cruzada. En aún otra forma de realización, el epítipo se selecciona de una secuencia proteica que figura en la tabla.

Existen procedimientos de preparación de anticuerpos policlonales (por ejemplo, Coligan, más arriba, y Harlow y Lane, más arriba). Los anticuerpos policlonales se puede producir en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunógeno y, si se desea, un adyuvante. Por lo general, el agente inmunógeno y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunógeno puede incluir una proteína codificada por un ácido nucleico de la Tabla 2 o un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Puede ser útil conjugar el agente inmunógeno con una proteína conocida por ser inmunógena en el mamífero que se inmuniza. Ejemplos de dichas proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a la hemocianina de lapa californiana, albúmina sérica, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden emplearse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Pueden utilizarse diversos protocolos de inmunización.

Los anticuerpos pueden ser, alternativamente, anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando procedimientos de hibridoma, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495. En un procedimiento de hibridoma, un ratón, hámster u otro animal hospedador apropiado, se suele

inmunizar con un agente inmunógeno para obtener linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunógeno. Alternativamente, los linfocitos pueden ser inmunizados *in vitro*. El agente inmunógeno por lo general incluirá un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la tabla o un fragmento del mismo, o una proteína de fusión del mismo. Generalmente, se utilizan linfocitos de la sangre periférica ("PBL") si se desean células de origen humano, o células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan entonces con una estirpe celular inmortalizada utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (por ejemplo, págs. 59-103 en Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* Academic Press). Las estirpes celulares inmortalizadas son generalmente células de mamífero transformadas, concretamente células de origen roedor, bovino o humano. Por lo general, se emplean estirpes celulares de rata o de ratón. Las células de hibridoma pueden cultivarse en un medio de cultivo adecuado que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células madre carecen de la enzima hipoxantina guanina fosfo-ribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá por lo general hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), sustancias que impiden el crecimiento de células con insuficiencia de HGPRT.

En una forma de realización, los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, anticuerpos que tienen especificidades de unión para por lo menos dos antígenos diferentes o que tienen especificidades de unión por dos epítopos en el mismo antígeno. En una forma de realización, una de las especificidades de unión es para una proteína codificada por un ácido nucleico de la tabla o un fragmento del mismo, la otra es para otro antígeno, y preferentemente para una proteína de superficie celular o receptor o subunidad de receptor preferentemente el que es específico para CS1. Alternativamente, la tecnología de tipo tetrámero puede crear reactivos polivalentes.

En otra forma de realización, los anticuerpos tienen bajas concentraciones o carecen de fucosa. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con un aumento de actividad de CCDA (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos), especialmente a bajas dosis de anticuerpos. Shields, RL, *et al.*, (2002) *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740; Shinkawa, T. *et al.*, (2003), *J. Biol. Chem.* 278:3466. Los procedimientos de preparación de anticuerpos sin fucosa incluyen el crecimiento en células YB2/O de mieloma de rata (ATCC CRL 1662). Las células YB2/O expresan bajas concentraciones de ARNm FUT8, que codifica una enzima (α 1,6-fucosiltransferasa) necesaria para la fucosilación de polipéptidos.

Los procedimientos alternativos para aumentar la actividad de CCDA incluyen mutaciones en el fragmento Fc de un anticuerpo CS1, especialmente las mutaciones que aumentan la afinidad del anticuerpo para un receptor Fc γ R. Se ha demostrado una correlación entre el aumento de la unión a Fc γ R con Fc mutado utilizando ensayos basados en células de citotoxicidad específica. Shields, RL *et al.* (2001) *J. Biol. Chem.* 276:6591-6604; Presta *et al.* (2002), *Biochem Soc. Trans.* 30:487-490. Los procedimientos para aumentar la actividad de CCDA mediante mutaciones específicas en la región Fc incluyen las variantes de Fc que comprenden por lo menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada de entre el grupo formado por: 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 y 332, en el que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. En una forma de realización preferida, dichas variantes de Fc comprenden por lo menos una sustitución seleccionada del grupo formado por L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239T, S239H, S239Y, V240I, V240A, V240T, V240M, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I, V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264Y, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266I, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H, N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, L328D, L328E, L328N, L328Q, L328F, L328I, L328V, L328T, L328H, L328A, P329F, A330L, A330Y, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, I332D, I332E, I332N, I332Q, I332T, I332H, I332Y y I332A, en el que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Variantes de Fc también pueden seleccionarse del grupo formado por V264L, V264I, F241W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V264I, F243L/V262I/V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264P, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, I332E, L328M/I332E, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, V264I/I332E, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239B, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N, S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, A330Y, I332D, N297S, N297D, N297S/I332E, N297D/I332E, N297E/I332E, D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332E, D265F/N297E/I332E, L328I/I332E, L328Q/I332E, I332N, I332Q, V264T, V264F, V240I, V263I, V266I, T299A, T299S, T299V, N325Q, N325L, N325I, S239D, S239N, S239F, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332D, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332E, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S,

L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239T, S239H, S239Y, V240A, V240T, V240M, V263A, V263T, V263M, V264M, V264Y, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, A298H, T299H, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, N325D, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, L328D/I332E, L328E/I332E, L328N/I332E, L328Q/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328H/I332E, L328I/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, I332A, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E, S239D/N297D/I332E, S239E/N297D/I332E, S239D/D265V/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E, S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, S239D/D265T/N297D/I332E, V264E/N297D/I332E, Y296D/N297D/I332E, Y296E/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, Y296Q/I297D/I332E, Y296H/N297D/I332E, Y296T/N297D/I332E, N297D/T299V/I332E, N297D/T299I/I332E, N297D/T299L/I332E, N297D/T299F/I332E, N297D/T299H/I332E, N297D/T299E/I332E, N297D/A330Y/I332E, N297D/S298A/A330Y/I332E, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332E, S239D/V264I/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, y S239D/264I/A330L/I332E, en el que la numeración de los restos en la región Fc es la del índice EU como en Kabat. Véase también PCT WO 2004/029207, 8 de abril de 2004.

La actividad de CCDAs asociada a anticuerpos puede seguirse y cuantificarse mediante la determinación de la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH) en el sobrenadante, que se libera rápidamente durante el daño a la membrana plasmática.

Otras formas de realización alternativas para activar la citotoxicidad de las células con el tratamiento con anticuerpos incluyen la estimulación de cascadas de señalización en la que intervienen anticuerpos que produce la muerte celular a las células unidas a anticuerpos. Además de la estimulación del sistema inmunitario innato en la que intervienen anticuerpos (por ejemplo, mediante células NK) también puede producir la muerte de células tumorales o células infectadas por virus.

Detección de la secuencia de CS1 para aplicaciones de diagnóstico

En un aspecto, los niveles de expresión en ARN de genes se determinan para diferentes estados celulares en el trastorno autoinmunitario o canceroso, por ejemplo, mieloma, fenotipo. Los niveles de expresión de genes en tejido normal (por ejemplo, sin sufrir un trastorno) y en tejido enfermo (y en algunos casos, por diferentes niveles de gravedad de los trastornos relacionados con el pronóstico, como se esboza a continuación) se evalúan para proporcionar perfiles de expresión. Un perfil de expresión génica de un estado celular o punto de desarrollo específico es esencialmente una "huella dactilar" del estado de la célula. Aunque dos estados pueden tener un determinado gen expresado de manera similar, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que es reflejo del estado de la célula. Al comparar los perfiles de expresión de células en diferentes estados, se obtiene la información relativa a qué genes son importantes (incluyendo regulación de genes tanto presión aumento como por disminución) en cada uno de estos estados. A continuación, puede realizarse o confirmarse el diagnóstico para determinar si una muestra de tejido tiene el perfil de expresión génica de tejido normal o enfermo. Esto proporcionará el diagnóstico molecular de enfermedades relacionadas.

"Expresión diferencial", o sus equivalentes gramaticales tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a las diferencias cualitativas o cuantitativas en los patrones de expresión génica temporal y/o celular de genes dentro y entre las células y los tejidos. Por lo tanto, un gen expresado de forma diferencial puede tener cualitativamente su expresión alterada, incluyendo una activación o inactivación, por ejemplo, en tejido normal frente a enfermo. Los genes pueden ser activados o desactivados en un estado concreto, en relación con otro estado, permitiendo así la comparación de dos o más estados. Un gen cualitativamente regulado presentará un modelo de expresión dentro de un estado o tipo celular que es detectable por técnicas habituales. Algunos genes se expresarán en un estado o tipo de célula, pero no en ambos. Alternativamente, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, por ejemplo, porque la expresión aumenta o disminuye; por ejemplo, la expresión génica está ya sea regulada por aumento, dando como resultado un aumento de la cantidad de transcrito, o regulada por disminución, dando como resultado una disminución en la cantidad de transcrito. El grado en el que la expresión difiere solo necesita ser lo suficientemente grande como para cuantificar a través de técnicas de caracterización habituales como las esbozadas a continuación, tal como mediante la utilización de chips de expresión Affymetrix GENECHIP® (microchip de ADN). Véase, Lockhart (1996) *Nature Biotechnology* 14:1675-1680. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, RCP cuantitativa con transcriptasa inversa, análisis Northern y la protección de ribonucleasa. Como se esbozó anteriormente, preferentemente el cambio de expresión (por ejemplo, regulación por incremento o regulación por disminución) es por lo menos aproximadamente 50%, más preferentemente por lo menos aproximadamente 100%, más preferentemente por lo menos aproximadamente 150%, más preferentemente por lo menos aproximadamente 200%, prefiriéndose especialmente desde 300 a por lo menos 1000%.

La evaluación puede ser en el transcrito del gen o en proteínas. La cantidad de expresión génica puede controlarse utilizando sondas de ácido nucleico para el ARN o ADN equivalente del transcrito del gen, y la cuantificación de los niveles de expresión génica, o, alternativamente, el propio producto génico final (proteína) se puede seguir, por ejemplo, con anticuerpos contra la proteína CS1 e inmunoanálisis estándar (ELISA, etc.) u otras técnicas, incluyendo los ensayos de espectroscopia de masas, ensayos de electroforesis en gel 2D, etc. Las proteínas correspondientes

a CS1, por ejemplo, las identificadas como importantes en un fenotipo de enfermedad, pueden evaluarse en una prueba de diagnóstico de la enfermedad. En otra forma de realización, el seguimiento de la expresión génica se realiza simultáneamente en numerosos genes. Se puede realizar también el seguimiento de la expresión de múltiples proteínas.

En esta forma de realización, las sondas de ácido nucleico CS1 están acopladas a biochips como se esboza en la presente memoria para la detección y cuantificación de secuencias de CS1 en una célula específica. Los ensayos se describen con más detalle más adelante en el ejemplo. Pueden utilizarse técnicas de RCP para proporcionar una mayor sensibilidad.

En una forma de realización se detectan ácidos nucleicos que codifican a CS1. Aunque el ADN o ARN que codifica la proteína CS1 se puede detectar, son de especial interés los procedimientos en los que se detecta un ARNm que codifica una proteína CS1. Las sondas para detectar el ARNm pueden ser sondas de nucleótido/desoxinucleótido que sea complementaria al ARNm y se hibrida con él, e incluyen, pero no se limitan a, oligonucleótidos, ADNc o ARN. Las sondas deben contener también un marcador detectable, tal como se define en la presente memoria. En un método, el ARNm se detecta después de inmovilizar el ácido nucleico que va a examinarse sobre un soporte sólido, tal como membranas de nilón e hibridar la sonda con la muestra. Tras el lavado para eliminar la sonda no unida específicamente, se detecta el marcador. En otro método, la detección del ARNm se realiza *in situ*. En este método las células permeabilizadas o las muestras de tejido se ponen en contacto con una sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable durante un tiempo suficiente para permitir que la sonda se hibride con el ARNm diana. Tras el lavado para eliminar la sonda no unida específicamente, se detecta el marcador. Por ejemplo, se detecta una ribsonda marcada con digoxigenina (sonda de ARN) que es complementaria al ARNm que codifica un mielomaproteína mediante la unión de la digoxigenina con un anticuerpo secundario anti-digoxigenina y desarrollado con nitro azul tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indoilo fosfato.

En otra forma de realización, varias proteínas de tres clases de proteínas descritas en la presente memoria (proteínas segregadas, transmembranarias o intracelulares) se utilizan en ensayos de diagnóstico. Las proteínas CS1, anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas y las células que contienen secuencias de CS1 se utilizan en ensayos de diagnóstico. Esto se puede realizar en un gen individual o en el polipéptido correspondiente. En una forma de realización, se utilizan perfiles de expresión, preferentemente junto con técnicas de cribado de alto rendimiento que permiten el seguimiento del perfil de expresión de los genes y/o polipéptidos correspondientes.

Como se describe y define en este documento, la proteína CS1 encuentra utilización como marcador de enfermedad de trastornos autoinmunitarios, tales como LED, AR y EII, y afecciones cancerosas, tales como mieloma y leucemia de células plasmáticas. Además, CS1 encuentra utilización como marcador para pronóstico o diagnóstico. La detección de estas proteínas en supuestos tejidos enfermos permite la detección, pronóstico o diagnóstico de dichas afecciones, y la selección de la estrategia terapéutica. En una forma de realización, se utilizan anticuerpos para detectar CS1. Un método preferido separa las proteínas de una muestra por electroforesis en un gel (por lo general un gel desnaturante de proteínas y reductor, pero puede ser otro tipo de gel, incluyendo geles de enfoque isoelectrónico y similares). Después de la separación de proteínas, se detecta CS1, por ejemplo, por inmunotransferencia con anticuerpos producidos contra CS1.

En otro método, los anticuerpos contra CS1 encuentran utilización en las técnicas de detección por la imagen *in situ*, por ejemplo, en histología. Véase, por ejemplo, Asai, *et al.* (Eds. 1993) *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology* (vol. 37) Academic Press. En este método, las células se ponen en contacto con uno a muchos anticuerpos contra la(s) proteína(s) de mieloma. Tras el lavado para eliminar la unión no específica de anticuerpos, se detecta la presencia del anticuerpo o anticuerpos. En una forma de realización, el anticuerpo se detecta por incubación con un anticuerpo secundario que contiene un marcador detectable. En otro procedimiento, el anticuerpo primario contra CS1 contiene un marcador detectable, por ejemplo, un marcador enzimático que puede actuar sobre un sustrato. En otra forma de realización, cada uno de los múltiples anticuerpos primarios contiene un marcador distinto y detectable. Este método encuentra utilización específica en la detección simultánea de CS1 junto con otros marcadores de las afecciones mencionadas anteriormente. La descripción proporciona también muchas otras técnicas histológicas de detección por la imagen.

En una forma de realización, el marcador se detecta con un fluorímetro que tiene capacidad para detectar y distinguir emisiones de diferentes longitudes de onda. Además, un clasificador de células activadas por fluorescencia (por sus siglas en inglés, FACS) se puede utilizar en el método.

En otra forma de realización, los anticuerpos encuentran utilización en el diagnóstico de trastornos autoinmunitarios, tales como LED, AR y EII, y cáncer, tal como mieloma y leucemia de células plasmáticas, en sangre, suero, plasma, heces y otras muestras. Dichas muestras, por lo tanto, son útiles como muestras en las que se va a probar o analizar la presencia de CS1. Los anticuerpos pueden utilizarse para detectar CS1 por técnicas de inmunoanálisis descritas anteriormente incluyendo ELISA, inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoprecipitación, tecnología BIAcore y similares. Por el contrario, la presencia de anticuerpos puede indicar una respuesta inmunitaria contra una proteína CS1 endógena.

En otra forma de realización, se realiza la hibridación *in situ* de sondas marcadas de ácidos nucleicos de CS1 a variedades de tejido. Por ejemplo, se preparan variedades de muestras de tejidos, incluyendo tejido enfermo y/o tejido normal. Se realiza a continuación la hibridación *in situ* (véase, por ejemplo, Ausubel, más arriba). Cuando se comparan las huellas digitales entre un individuo y un patrón, un diagnóstico, un pronóstico o una predicción pueden basarse en los resultados. Se entiende además que los genes que indican el diagnóstico pueden diferir de los que indican el pronóstico y las características moleculares del estado de las células pueden conducir a distinciones entre afecciones que responden o no al tratamiento o puede ser pronóstico de resultados.

En una forma de realización, las proteínas CS1, los anticuerpos, los ácidos nucleicos, las proteínas modificadas y las células que contienen secuencias de CS1 se utilizan en ensayos de pronóstico. Como anteriormente, se pueden generar características de la expresión génica que se correlacionan con una enfermedad, información clínica, patológica, o de otro tipo, desde el punto de vista del pronóstico a largo plazo. Una vez más, esto se puede hacer ya sea en proteínas o genes, prefiriéndose la utilización de genes. Pueden ser útiles genes aislados o múltiples en diversas combinaciones. Como anteriormente, las sondas de CS1 se pueden acoplar a biochips para la detección y cuantificación de secuencias de CS1 en un tejido o paciente. Los ensayos procedieron como se esbozó anteriormente para el diagnóstico. El método de la RCP puede proporcionar una cuantificación más sensible y precisa.

Los genes útiles en ensayos de pronóstico son genes que se expresan de manera diferenciada según la fase de la enfermedad del paciente. En una forma de realización, los genes pueden ser expresados únicamente según la fase del paciente. Por ejemplo, en el mieloma, a los pacientes se les conceden tres etapas diferentes según la fase y localización de la enfermedad: Fases I, II y III. En la fase I, los síntomas son leves a inexistentes, con muchos pacientes que no presentan síntomas de mieloma. Un diagnóstico positivo es la presencia de células tumorales, sin embargo, el número de glóbulos rojos en la sangre es normal o ligeramente inferior al intervalo normal, no hay un aumento detectable en el calcio en la sangre, hay concentraciones muy bajas de proteína M en la sangre u orina, y no pueden apreciarse lesiones óseas detectables en las radiografías. En la fase II, las células cancerosas son frecuentes en cifras más altas. La función renal puede verse afectada, lo cual empeora el diagnóstico para el pronóstico de la mayoría de los pacientes. La fase III produce anemia, hipercalcemia, daño óseo avanzado y altas concentraciones de proteína M en la sangre y la orina. La correlación de la expresión de proteínas con diferentes fases en el trastorno autoinmunitario también podría resultar útil en la determinación del pronóstico de dichos trastornos. La correlación de genes expresados en las diferentes etapas, ya sea expresados exclusivamente o que tienen niveles de expresión diferenciados según la fase, se puede utilizar para determinar la viabilidad de producir la remisión en un paciente. Esto sería especialmente útil en las etapas iniciales de la enfermedad, cuando los pacientes con mieloma presentan pocos síntomas. Además, los genes que se expresan indicando la aparición de complicaciones a largo plazo, tales como beta-2-microglobulina (indicador de daño renal), así como altas concentraciones de albúmina de suero y lactato deshidrogenasa, también puede ser útiles como herramienta para pronóstico.

La correlación de genes expresados en diferentes etapas, ya sea expresados exclusivamente o que tienen niveles de expresión diferenciados según la fase, también puede seguirse para determinar la eficacia de tratamiento utilizando los agentes terapéuticos descritos en la presente invención. Por ejemplo, en los pacientes tratados con antagonistas de la presente invención puede hacerse el seguimiento de la eficacia terapéutica de dichos antagonistas a través del seguimiento de marcadores, incluyendo, por ejemplo, CS1 o CS1 en combinación con marcadores específicos del trastorno (por ejemplo, el seguimiento de la proteína M para el tratamiento del mieloma. El seguimiento de estos marcadores específicos será importante en la determinación de la eficacia terapéutica de la invención, así como para determinar la dosis y consideraciones del método de tratamiento para diferentes indicaciones de la presente invención.

Provocación de trastornos como sistemas modelo *in vivo*

Enfermedad Inflamatoria intestinal

Se han desarrollado modelos experimentales *in vivo* para la investigación de procesos patológicos de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sartor RB, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11:89-96 (1997). Por ejemplo, se pueden preparar ratones transgénicos modificados genéticamente, en los que se interrumpe el gen de la enfermedad inflamatoria intestinal o en los que se inserta un gen de la enfermedad inflamatoria intestinal. Se pueden preparar ratones transgénicos modificados genéticamente mediante la inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio del gen endógeno de la enfermedad inflamatoria intestinal en el genoma de ratón por recombinación autóloga. Dichos ratones también se puede preparar sustituyendo el gen endógeno de la enfermedad inflamatoria intestinal por una versión mutada del gen de la enfermedad inflamatoria intestinal, o por mutación del gen endógeno de la enfermedad inflamatoria intestinal, por ejemplo, por exposición a agentes cancerígenos.

Un montaje de ADN se introduce en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética recién modificada genéticamente se inyectan en un embrión de ratón hospedador, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones híbridos que poseen células

germinales parcialmente derivadas de la estirpe celular mutante. Por lo tanto, criando ratones híbridos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi, *et al.* (1989) *Science* 244:1288-1292). Ratones híbridos diana se pueden derivar según Hogan, *et al.* (1988) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* CSH Press; y Robertson (ed. 1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Washington, DC.

Se pueden construir otros modelos utilizando manipulación no genética de modelos animales. Un modelo en especial se ha utilizado extensamente en el cribado de pequeñas moléculas. Este modelo provoca colitis en ratas o ratones con una sola prueba de provocación intracolónica con una solución del hapteno 2,4,-trinitrobenceno sulfónico (TNBS). GP Morris *et al.*, *Gastroenterology* 96:795-803 (1989); Boughton-Smith NK, *Br. J. Pharmacol.* 94:65-72 (1988). El tratamiento con TNBS produce una intensa respuesta inflamatoria local que alcanza su punto más bajo después de 2 a 3 días, y puede durar hasta 21 días, dependiendo de la gravedad de la prueba de provocación.

La respuesta inflamatoria producida por el tratamiento con TNBS se considera para reproducir muchas de las características macroscópicas, histológicas e inmunológicas de la enfermedad de Crohn. Grisham M.B. *et al.*, *Gastroenterology* 101:540-547 (1991); Yamada Y. *et al.*, *Gastroenterology* 102:524-534 (1992); Torres M.I. *et al.*, *Dig. Dis. Sci.* 44:2523-29 (1999); Neruath M., Fuss I., Strober W., *Int. Rev. Immunol.* 19:51-62 (2000). Se observa ulceración abierta, con inflamación transparietal y engrosamiento de la pared intestinal. Las características histológicas incluyen arquitectura distorsionada de la cripta, atrofia de la cripta, granulomas, células gigantes, agregados linfoides basales y la presencia de un infiltrado inflamatorio.

El modelo se ha utilizado para estudiar y validar la inflamación del colon, y estudia aspectos de la enfermedad inflamatoria intestinal. Hoffman P. *et al.*, *Gut* 41:195-202 (1997); Jacobson K., McHugh K., Collins S.M., *Gastroenterology* 112:156-62 (1997).

Otros modelos animales incluyen ratas transgénicas HLA-B27 (Hammer R.E. *et al.*, Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and Human b2M: An animal model of HLA-B27 associated human disorders, *Cell* 63:1088-1112 (1990)), ratones transgénicos que carecen de IL-2 (Baumgart D.C. *et al.*, Mechanisms of intestinal epithelia cell injury and colitis in interleukin 2 deficient mice, *Cell Immunol.* 187:52-66 (1998)), Ratones carentes de mdrla (Panwala C.M. *et al.*, A Novel Model of Inflammatory Bowel Disease: Mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdrla, spontaneously develop colitis, *J. Immunol.* 161:5733-44 (1998)), y ratones que carecen de IL 10 (Freeman H.J., Studies on the interleukin-10 gene in animal models of colitis, *Canadian Gastroenterology* (2003)).

Mieloma

Se han desarrollado experimentales modelos *in vivo* para la investigación de procesos patológicos de mieloma. Sartor R.B., *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11:89-96 (1997). Por ejemplo, se pueden preparar ratones transgénicos modificados genéticamente, en los que el gen del mieloma se interrumpe o en el que se inserta un gen de mieloma. Se pueden preparar ratones transgénicos modificados genéticamente por inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio del gen endógeno de mieloma en el genoma de ratón por recombinación autóloga. Dichos ratones también se pueden preparar sustituyendo el gen endógeno de mieloma por una versión mutada del gen de mieloma, o mutando el gen endógeno de mieloma, por ejemplo, por exposición a agentes cancerígenos.

Un montaje de ADN se introduce en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética recién modificada genéticamente se inyectan en un embrión de ratón hospedador, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones híbridos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la estirpe celular mutante. Por lo tanto, al criar los ratones híbridos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi, *et al.* (1989) *Science* 244:1288-1292). Ratones híbridos objetivo pueden obtenerse según Hogan, *et al.* (1988) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* CSH Press; y Robertson (ed. 1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Washington, D.C.

Otros modelos se pueden construir utilizando manipulación no genética de modelos animales. Por ejemplo, inyectando ratones C57BL/6J con tumores de linfocitos B (por ejemplo, células LLC) puede provocar metástasis pulmonar. Otros modelos animales utilizan ratones SCID e inyectan estirpes tumorales de linfocitos B (por ejemplo, células HsSultan (ATCC) o múltiples estirpes de mieloma, (por ejemplo pero no se limitan a, L363, LP-1, OPM-2, o RPMI 8226) para inducir características similares a las de mieloma. Todavía otros modelos animales incluyen un modelo de ratón NOD/SCID para el mieloma múltiple humano generado por la implantación de huesos fetales humanos (FB) en puntos subcutáneos de los ratones NOD/SCID, seguido por la inoculación con células primarias mononucleares de médula ósea obtenidas de pacientes con mieloma múltiple en los FB. Véase Shang-Yi H., *et al.*, *Amer. J. Invest. Pathol.* 164:747-756 (2004). Modelos de plasmacitoma de ratón, cuya formación se induce mediante tratamiento aceite de prístano (2,6,10,12-tetrametilpentadecano) también pueden utilizarse. Además, pueden utilizarse también modelos de ratón en los que la inyección de células de mieloma directamente en la médula ósea (modelo de inyección ortotópica) de ratones SCID, SCID/beige o NOD/SCID.

Las células que sufren transformación, como en células de mieloma, liberar una mayor cantidad de ciertos factores (en lo sucesivo "marcadores específicos de mieloma") que sus contrapartidas normales. Por ejemplo, CD38, CD9, CD10, HLA-DR y CD20 y se incrementan en la expresión en células de mieloma. Ruiz-Aurgelles G.J. y San Miguel J.F., *Cell Surface Markers in Multiple Myeloma*, *Mayo Clin. Proc.* 69:684-90 (1994).

Varias técnicas que miden la liberación de estos factores se describen en Freshney (1998), más arriba. También, véase, Unkeless, *et al.* (1974) *J. Biol. Chem.* 249:4295-4305; Strickland y Beers (1976) *J. Biol. Chem.* 251:5694-5702; Whur, *et al.* (1980) *Br. J. Cancer* 42:305-312; Gullino "Angiogenesis, tumor vascularization, and potential interference with tumor growth" págs. 178-184 en Mihich (ed. 1985) *Biological Responses in Cancer* Plenum; Freshney (1985) *Cancer Res.* 5:111-130.

Procedimientos terapéuticos

Tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria

En un aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento para reducir la proliferación, adhesión, diferenciación, activación y/o coactivación de los leucocitos, que comprende poner en contacto los leucocitos con un antagonista de CS1 descrito en la presente memoria.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método para reducir la secreción (o producción) de inmunoglobulina por linfocitos (tales como linfocitos B), que comprende poner en contacto los linfocitos con un antagonista de CS1 descrito en la presente memoria. Los antagonistas de la presente invención pueden reducir la producción de inmunoglobulina (como por ejemplo, IgM, IgG, IgD, IgA e IgE) por lo menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, o 50%. El cambio porcentual se calcula sustrayendo la concentración de inmunoglobulina antes de la administración de la primera dosis del anticuerpo (día 0) de la concentración de inmunoglobulina después de la dosis (día x), dividiendo por la concentración de inmunoglobulina antes de la primera dosis (día 0) y multiplicando por 100, por ejemplo, $[(\text{día } x - \text{día } 0)/\text{día } 0] \times 100$.

Aún en otro aspecto, la presente descripción se refiere a un procedimiento de inducción de apoptosis o citólisis de células que expresan CS1 que comprende poner en contacto las células con un anticuerpo contra CS1 descrito en la presente memoria. En una forma de realización preferida, la inducción se consigue por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En general, los anticuerpos de la presente descripción se unen a antígenos en la superficie de las células diana (células que expresan CS1) en presencia de células efectoras (tales como células destructoras naturales o macrófagos). Receptores de Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc señala las células efectoras para destruir las células diana por citólisis o apoptosis. La citólisis se puede detectar mediante la detección de la liberación de marcador o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o detección de una viabilidad reducida de las células diana (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos para la apoptosis pueden realizarse por el ensayo de marcaje del extremo con muesca digoxigenina-11-dUTP en el que interviene desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Lazebnik *et al.*, *Nature*: 371, 346 (1994). La citotoxicidad también se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tal como el kit de detección de citotoxicidad de Roche *Applied Science* (Indianapolis, IN). Preferentemente, los anticuerpos de la presente descripción inducen por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% u 80% de citotoxicidad de las células diana. El porcentaje se calcula por los procedimientos dados a conocer en los Ejemplos.

Los antagonistas pueden ponerse en contacto con los leucocitos *in vitro* (tal como, añadiendo los antagonistas en un medio de cultivo celular en el que se cultivan leucocitos), *ex vivo* o *in vivo* (por ejemplo, mediante la administración de los antagonistas a un paciente).

En una forma de realización preferida, los leucocitos son a) linfocitos activados, tales como linfocitos B y/o linfocitos T, preferentemente linfocitos B CD19⁺ y/o linfocitos T CD3⁺; b) células CD14⁺ activadas y/o ingenuas; c) dendrocitos activados y/o inactivados y/o c) células CD56⁺ NK y/o NKT.

En un aspecto preferido, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B, en un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de CS1 a dicho paciente.

En otro aspecto preferido, la presente descripción proporciona un procedimiento para inducir citotoxicidad, citólisis, y/o apoptosis de células que expresan CS1 en un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo de CS1 a dicho paciente.

Los antagonistas, preferentemente anticuerpos de la presente descripción, se pueden utilizar para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitarse a, la enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades autoinmunitarias del ojo tales como uveítis, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves,

síndrome de Guillain-Barré, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso diseminado (LED), esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, colitis ulcerosa y/o vasculitis.

En una forma de realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria que puede prevenirse y/o tratarse con los métodos de la presente descripción es LED, AR o EII. Después de que se administra a un paciente que ha desarrollado los síntomas de LED, AR o EII, los anticuerpos anti-CS1 deben ser capaces de reducir la gravedad de los síntomas. Alternativamente, los anticuerpos anti-CS1 se pueden administrar a un paciente antes de que el paciente desarrolle cualquier manifestación clínica de LED, AR o EII. Dicha administración preventiva de los anticuerpos debe impedir completamente que el paciente desarrolle cualquier síntoma de LED, AR o EII o al menos impedir que el paciente desarrolle síntomas tan graves como en la afección sin tratamiento con anticuerpos. La gravedad de los síntomas de LED, AR o EII puede medirse por la prueba clínica estándar para LED, AR o EII conocida en la técnica, tal como la concentración en el suero de anticuerpos anti-ADN, proteinuria y la tasa de mortalidad de los pacientes.

Los procedimientos terapéuticos se aplican generalmente a pacientes humanos, pero pueden aplicarse a otros mamíferos.

Tratamiento del cáncer

Se incluyen también métodos terapéuticos para reducir la proliferación de las células del mieloma, que comprenden poner en contacto células de mieloma con un antagonista de una proteína de mieloma, preferentemente un anticuerpo u otro antagonista, tal como los anticuerpos de CS1 descritos en la presente memoria. Por ejemplo, los anticuerpos pueden ponerse en contacto con células de mieloma *in vitro* (tal como, añadiendo los antagonistas en un medio de cultivo celular, donde se cultivan las células de mieloma), *ex vivo*, o *in vivo* (por ejemplo, administrando los antagonistas a un paciente). En otro aspecto, las utilidades de la presente invención posibilitan un procedimiento para reducir la proliferación de células de mieloma, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de la proteína de mieloma a dicho paciente.

En un aspecto, los anticuerpos utilizados en la presente invención, impiden o tratan el mieloma. Una vez que se administran a un paciente que ha desarrollado los síntomas de mieloma, los anticuerpos deberían poder reducir la gravedad de los síntomas. Alternativamente, los anticuerpos utilizados en la presente invención pueden administrarse a un paciente antes de que el paciente desarrolle cualquier manifestación clínica de mieloma. La gravedad de los síntomas de mieloma puede medirse por la prueba clínica habitual para mieloma conocida en la técnica, análisis de huesos por densidad de rayos X, concentraciones de microglobulina beta-2 o hipercalcemia. Se aplican habitualmente métodos terapéuticos a pacientes humanos pero se pueden aplicar a otros mamíferos.

Aún en otro aspecto, la presente descripción se refiere a un método de inducción de la apoptosis o citólisis de células que expresan CS1 que comprende poner en contacto las células con un anticuerpo contra CS1 descrito en la presente memoria. En una forma de realización preferida, la inducción se consigue mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). En general, los anticuerpos de la presente invención se unen a antígenos sobre la superficie de las células diana (células que expresan a CS1) en presencia de células efectoras (tales como células destructoras naturales o macrófagos). Receptores de Fc en las células efectoras reconocen anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc señala las células efectoras para destruir las células diana por citólisis o apoptosis. La citólisis se puede detectar mediante la detección ya sea de la liberación del marcador o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o detección de la viabilidad reducida de la célula diana (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos para la apoptosis pueden realizarse por el ensayo de marcaje del extremo con muesca digoxigenina-11-dUTP en el que interviene desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Lazebnik *et al.*, *Nature*: 371, 346 (1994)). La citotoxicidad también se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tal como el kit de detección de citotoxicidad de Roche *Applied Science* (Indianapolis, IN). Preferentemente, los anticuerpos de la presente descripción inducen por lo menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60% u 80% de citotoxicidad de las células diana. El porcentaje se calcula por los procedimientos dados a conocer en los Ejemplos.

Los antagonistas pueden también ponerse en contacto con leucocitos *in vitro* (tal como, añadiendo los antagonistas en un medio de cultivo celular donde se cultivan los leucocitos), *ex vivo* o *in vivo* (por ejemplo, administrando los antagonistas a un paciente).

En una forma de realización preferida, los leucocitos son a) linfocitos activados, tales como linfocitos B y/o linfocitos T, preferentemente linfocitos B CD19⁺ y/o linfocitos T CD3⁺; b) células CD14⁺ activadas y/o ingenuas; c) dendrocitos activados y/o inactivados, y/o c) células CD56⁺ NK y/o NKT.

En un aspecto preferido, la presente descripción proporciona un procedimiento para reducir la secreción de inmunoglobulina por linfocitos B, en un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de un antagonista de CS1 a dicho paciente. Dicha reducción de la secreción de inmunoglobulina por los linfocitos B puede ayudar a aliviar las complicaciones del mieloma, incluido el síndrome de hiperviscosidad.

En otro aspecto preferido, la presente descripción proporciona un procedimiento para provocar citotoxicidad, citólisis y/o apoptosis de células que expresan CS1 en un paciente que lo necesite, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo de CS1 a dicho paciente.

Administración de agentes terapéuticos

Existen varios procedimientos de administración de los antagonistas, por ejemplo, anticuerpos de acuerdo con la presente invención. Se prefiere la administración parenteral. El anticuerpo se puede administrar a un paciente por vía intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo; o por vía intramuscular, subcutánea, intraperitoneal o intracefalorraquídea. Las vías oral, tópica, por inhalación, u otros medios de administración conocidos por los expertos en la técnica también están incluidos en la presente invención.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción normalmente comprenden una solución de antagonistas (por ejemplo, anticuerpos), o una mezcla de los mismos disuelta en un portador aceptable, preferentemente un portador acuoso. Una variedad de portadores acuosos puede utilizarse, por ejemplo, agua para inyectables (por sus siglas en inglés, WFI) o agua tamponada con fosfato, citrato, acetato, etc. a un pH por lo general de 5,0 a 8,0, más a menudo de 6,0 a 7,0, y/o que contienen sales tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc. para hacerla isotónica. El portador también puede contener excipientes tales como albúmina de suero humano polisorbato, 80, azúcares o aminoácidos para proteger a la proteína activa. La concentración de un antagonista (por ejemplo, anticuerpo) en estas formulaciones oscila ampliamente desde alrededor de 0,1 a 100 mg/ml, pero a menudo está comprendida en el intervalo de 1 a 10 mg/ml. El anticuerpo monoclonal formulado es especialmente adecuado para la administración parenteral, y puede administrarse como una infusión intravenosa o por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. Los procedimientos reales para preparar composiciones administrables por vía parenteral son conocidos o evidentes para los expertos en esta materia y se describen con más detalle, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Science (15ª Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en la presente memoria.

Las composiciones se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos, que comprenden la inhibición de las interacciones entre un CS1 y su sustrato celular, la inhibición de la adhesión de células enfermas, o la prevención y/o reducción de los síntomas clínicos de los trastornos anteriores. Una cantidad adecuada para conseguir cualquiera de estos efectos deseados se define como una "cantidad eficaz". Los anticuerpos pueden administrarse a un paciente por administración única o múltiple.

Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de los antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad, los antecedentes y la respuesta del paciente, la toxicidad de los anticuerpos y de la discreción del médico adjunto. Los antagonistas se administran adecuadamente al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos. La dosis experimental inicial puede administrarse a un paciente. La dosis apropiada y el régimen de tratamiento pueden comprobarse por el seguimiento de la evolución de la terapia utilizando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la materia.

Además, se pueden utilizar antagonistas (tales como anticuerpos) solos en forma sustancialmente pura, o junto con agentes terapéuticos para las enfermedades autoinmunitarias conocidas por los expertos en la materia. Otras terapias que pueden utilizarse junto con el tratamiento con los anticuerpos incluyen la administración de moléculas de la cadena complementaria de ácido nucleico o productos biológicos, tales como anticuerpos terapéuticos adicionales. Así pues, el tratamiento de la presente descripción se formula de manera que permite que sea administrado en serie o en combinación con otro agente para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Para el tratamiento de trastornos autoinmunitarios y el mieloma, el anticuerpo a menudo se administrará después o en combinación con uno u otros fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores más.

Kits para su utilización en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

Para su utilización en las aplicaciones de diagnóstico y de investigación sugeridas anteriormente, se proporcionan también kits en la descripción. En aplicaciones de diagnóstico y de investigación, dichos kits pueden incluir al menos uno de los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, ácidos nucleicos o anticuerpos específicos para CS1, sondas de hibridación y/o cebadores, polinucleótidos de la cadena complementaria, ribozimas, polipéptidos o polinucleótidos de CS1 negativos dominantes, pequeñas moléculas inhibitoras de secuencias asociadas a CS1, etc.

Además, los kits pueden incluir observaciones de instrucción que contienen instrucciones (por ejemplo, protocolos) para la puesta en práctica de los procedimientos de esta descripción. Aunque las observaciones de instrucción por lo general comprenden materiales escritos o impresos, no se limitan a éstos. La presente invención contempla un medio capaz de almacenar dichas instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Dichos medios incluyen, pero no se limitan a, medios electrónicos de almacenamiento (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones a páginas de Internet que proporcionan dichas observaciones de instrucción.

La presente descripción también proporciona kits para la detección de moduladores de secuencias asociadas a CS1. Dichos kits pueden prepararse a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, dichos kits pueden comprender uno o más de los siguientes materiales: un polipéptido o polinucleótido asociado a CS1, tubos de reacción e instrucciones para pruebas de actividad asociada a CS1. Opcionalmente, el kit contiene proteína CS1 biológicamente activa. Una amplia variedad de kits y componentes pueden prepararse según la presente invención, dependiendo del usuario al que va dirigido el kit y de las necesidades particulares del usuario. El diagnóstico por lo general implicaría la evaluación de un gran número de genes o productos. Los genes por lo general se seleccionarían basándose en correlaciones con parámetros importantes de enfermedades que pueden identificarse en los datos históricos o de resultados.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de CS1

CS1 se identificó a partir de una genoteca sustractiva de ADNc de subconjuntos de linfocitos B (vírgenes frente linfocitos B del plasma con memoria+) de la sangre periférica normal de adulto sano. CS1 se expresó preferentemente entre los linfocitos B con memoria y del plasma. Se produjeron genotecas sustractivas siguiendo el protocolo descrito a continuación:

Aislamiento de subconjuntos de linfocitos B:

Células mononucleares de sangre periférica (CMSP) se aislaron de nueve donantes adultos sanos con gradientes patrón de Ficoll-Hypaque. Se aislaron linfocitos B procedentes de las CMSP siguiendo un protocolo habitual de selección negativa. Se incubaron las CMSP en una mezcla de anticuerpos CD2, CD3, CD4, CD14, CD16, CD56, CD66 purificados de ratón anti-humano y glucoforina A. Después de la incubación y el lavado, perlas magnéticas Dynal anti-ratón en cabra se añadieron a razón de 7 a 10 perlas por célula. Posteriormente, las células unidas al anticuerpo se aislaron con un soporte magnético Dynal convencional para dejar los linfocitos B enriquecidos en los sobrenadantes. Los sobrenadantes recogidos se lavaron con RPMI + 10% de suero fetal bovino (SFB).

Clasificación de subconjuntos de linfocitos B (vírgenes frente a linfocitos B con memoria + plasmáticos):

Linfocitos B enriquecidos en Dynal se tiñeron con IgD-FITC, CD38-cychrome, CD19-APC y CD27-PE siguiendo los protocolos habituales de tinción. Las dos poblaciones independientes de linfocitos B vírgenes ($\text{IgD}^+\text{CD19}^+\text{CD38}^{\text{int/}}\text{CD27}^-$) frente a linfocitos B con memoria y plasmáticos ($\text{IgD}^+\text{CD19}^+\text{CD38}^{\text{int/}}\text{CD27}^+$) se clasificaron en un citómetro de flujo-MLS de alta resolución MoFlo, que está equipado con un láser de argón Spectra Physics refrigerado por aire (488 nm) y un láser de diodo de 635 nm y con filtros para la detección de FITC en 530/40 nm, PE a 580/30 nm, APC a 670/20 nm y cychrome (PE-Cy5) a 670/30 nm. Se analizó la pureza de los linfocitos B clasificados en el citómetro MoFlo y resultó ser del 97% (linfocitos B con memoria y plasmáticos) y 98% de pureza (linfocitos B vírgenes). Las células clasificadas se colocaron en Trizol y se almacenaron a -70°C.

Producción de la genoteca de ADNc:

Se prepararon genotecas sustractivas de ADNc a partir de los subconjuntos de linfocitos B clasificados utilizando un protocolo estándar de hibridación sustractiva por análisis de diferencias de representación. Las genotecas sustractivas incluían la genoteca de linfocitos B con memoria + plasmáticos, donde el ADNc se sustrajo dos veces, y la genoteca de ADNc con linfocitos B vírgenes, donde el ADNc con memoria + plasmático se sustrajo dos veces. Con técnicas habituales de biología molecular, la genoteca sustractiva de ADNc se ligó en un vector plásmido normal y se transformó en células electrocompetitivas de *E. coli* (DH-10B). Las células *E. coli* transformadas se sembraron en placas de agar-agar LB en presencia de antibióticos de selección. Se ampliaron las colonias de bacterias aisladas, representando cada una una inserción específica, utilizando la RCP de colonias patrón.

Detección y confirmación de la expresión diferencial:

Los productos de inserción de genotecas sustractivas de ADNc se desnaturalizaron y se transfirieron a 2 filtros de nilón idénticos y se hibridaron por separado con dos sondas marcadas y desnaturalizadas diferentes-(memoria + plasma)-ADNc virgen (sustraído dos veces) y ADNc virgen-(memoria + plasma) (sustraído dos veces). Un producto de inserción de la genoteca sustractiva de ADNc se consideraba positivo si el producto de inserción se hibridaba de manera selectiva preferentemente con una de las dos sondas. Los clones de ADNc para CS1 se hibridaron preferentemente con la - sonda de ADNc virgen-(memoria + plasma) (sustraída dos veces).

Identificación de CS1:

Se cultivaron células bacterianas transformadas con clones positivos y se aisló el ADN con un kit Qiagen®Mini-Prep (preparaciones de diagnóstico *in vitro*) siguiendo el protocolo del fabricante (Qiagen, Valencia, California). Los plásmidos purificados se secuenciaron y se determinó la identidad de la secuencia de ADN mediante la búsqueda en

bases de datos NCBI.

Caracterización y confirmación de la expresión génica de CS1:

5 La expresión preferente de los clones positivos seleccionados, incluyendo CS1, se confirmó por análisis de hibridación en mancha. Cantidades iguales de ADNc(no sustraído) (20 ng) se aislaron de linfocitos B con memoria + plasmáticos se salpicaron en filtros de nilón y se hibridaron con el producto de inserción de ADNc marcado para el clon positivo. Para estos ensayos, se sintetizó ADNc a partir de subconjuntos de linfocitos B de sangre periférica obtenidos a partir de 2 tipos diferentes (n = 9 adultos sanos y n = 10 adultos sanos, pureza >97% y >98%,
10 respectivamente). Se lavaron los filtros y se detectó por autorradiografía la señal de las sondas hibridadas. Un clon se consideraba positivo si ADNc hibridado preferentemente al ADNc de linfocitos B con memoria + plasmáticos a través de ambos conjuntos de linfocitos B vírgenes clasificados frente a con memoria + plasmáticos de las. Los datos indicaron que CS1 se expresa predominantemente en los linfocitos B del plasma y con memoria.

15 *CS1 se expresa principalmente en el tejido linfóide:*

Se prepararon hibridaciones en manchas a partir de ADNc sintetizado a partir de poliA⁺ ARN, que se adquirió en Clontech (Palo Alto, California) y se hicieron de los siguientes tejidos: bazo, ganglios linfáticos, médula ósea, intestino delgado, cerebro, pulmón, músculo esquelético, corazón, riñón e hígado. Las hibridaciones en manchas se probaron con ADN de CS1 marcado con digoxigenina (DIG) y se visualizaron por quimioluminiscencia (anticuerpos anti-DIG y CDP-Star marcados con fosfatasa alcalina) siguiendo las recomendaciones del fabricante (kit DIG de Boehringer-Mannheim). Los resultados indican que CS1 se expresa principalmente en tejidos linfoides (bazo, ganglios linfáticos, médula ósea e intestino delgado, posiblemente debido a los linfocitos residuales en las placas de Peyer) y falta o baja en otros órganos no linfoides (cerebro, pulmón, músculo esquelético, corazón, riñón e hígado).
20

25 **Ejemplo 2: Expresión diferencial de CS1**

Células humanas:

30 Se obtuvieron por aislamiento células mononucleares de sangre periférica (CMSP) a partir de gradientes de Ficoll-Hypaque estándar. Las CMSP aisladas se volvieron a poner en suspensión a razón de 2×10^6 células/ml en un medio de cultivo reciente. Se estimularon las CMSP con fitohemaglutinina (PHA) a una concentración de 3 µg/ml durante 3 días, o con mitógeno de hierba carmín (por sus siglas en inglés, PWM) a una concentración de 10 µg/ml durante 8 días. Se prepararon CMSP no estimuladas de referencia sin ningún estímulo. Las células se cultivaron a
35 37°C en 7% de CO₂ en medio RPMI con FBS al 10%, penicilina, estreptomycin, y aditivos de glucosa.

Células del ratón:

40 Se extrajeron los bazos de dos ratones Balb/c. Los bazos se colocaron sobre un filtro de 100 micras. Las células se disgregaron y se lavaron con PBS, y se centrifugaron a 1.500 rpm durante 10 minutos. Se lisaron glóbulos rojos con 2 ml de tampón de lisis a 37°C durante 2 minutos. Las células se lavaron dos veces, se volvieron a poner en suspensión en 10 ml del medio y se contaron. Una parte de las células no estimuladas se congeló directamente. Las células restantes se estimularon con A a una concentración de 5 µg/ml durante 3 días, o con LPS a una concentración de 1 µg/ml durante 3 días. Las células se cultivaron en un medio DMEM con FBS al 10%, antibióticos y aditivos de glucosa.
45

Linfocitos B de pacientes de lupus en comparación con los de individuos sanos de la misma edad:

50 Se clasificaron linfocitos B de células mononucleares de sangre periférica de paciente de lupus y de individuos sanos, mediante tiñendo las células con anticuerpo CD19 anti-humano marcado con FITC. Las células se clasificaron en un citómetro de flujo-MLS de alta resolución MoFlo como se describe en el Ejemplo 1. Las células se recogieron en medio estéril para la síntesis de ARN.

Aislamiento de ARN completo por RCP en tiempo real:

55 Las células se lavaron una vez y se colocaron en Trizol™ (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), y el ARN completo se aisló siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN completo se trató con desoxirribonucleasa sin ribonucleasa (GenHunter, Nashville, Tennessee). ARN digerido con desoxirribonucleasa se extrajo con fenol/cloroformo y se precipitó con etanol durante la noche. El ARN se lavó con etanol al 75% y se disolvió en agua sin nucleasa. El ARN aislado se cuantificó y su totalidad se analizó en un gel de agarosa.
60

RCP en tiempo real:

65 El ARN completo (2 mg) se transcrito a la inversa del paciente de lupus en comparación con linfocitos B clasificados de individuos sanos en 100 µl de mezcla de reacción utilizando reactivos Taqman estándar de transcripción inversa (Applied Biosystems, Foster City, California). Se montaron las reacciones de RCP utilizando SYBR Green RCP

Master Mix de Applied Biosystems. Se incorporaron cebadores de CS1 en la mezcla para examinar los niveles de expresión de CS1 en ADNc del paciente de lupus y de individuos sanos. Los cebadores de CS1 se diseñaron a partir de las secuencias publicadas (número de registro en Genbank XM-001635, AF390894). Los cebadores de β -actina y 18S ARNr se utilizaron como referencias para la normalización. Se diseñaron cebadores utilizando el programa informático Primer Express adquirido en Applied Biosystems. Los productos de RCP ampliados fueron de 85 pb para cebadores de CS1, 84 pb para cebadores de β -actina, y 61 pb para cebadores de 18S ARNr. Se realizó RCP en tiempo real en un sistema GeneAmp 5700 SDS de Applied Biosystems, utilizando el protocolo recomendado.

RCP en tiempo real de nuevo Ly9 de ratón:

Se transcribió a la inversa ARN completo (2 μ g) a partir de conA, LPS, y en muestras no estimuladas de 100 μ l de mezcla de reacción utilizando reactivos patrón Taqman de transcripción inversa (Applied Biosystems). Se montó una reacción de RCP utilizando SYBR Green RCP Master Mix de Applied Biosystems. Se diseñaron cebadores específicos para nuevo LY9 de ratón a partir de la secuencia publicada (número de acceso en Genbank AF467909) y se incorporaron en la mezcla para examinar los niveles de expresión en muestras de ADNc estimuladas frente a no estimuladas. Se utilizaron cebadores 18S ARNr para la normalización. Los cebadores se diseñaron utilizando el programa informático Primer Express adquirido de Applied Biosystems. Los productos de RCP ampliados fueron de 65 pb para los cebadores LY9 de ratón y de 61 pb para los cebadores 18S ARNr. La RCP en tiempo real se realizó en un GeneAmp 5700 Sequence Detection System de Applied Biosystems, utilizando el protocolo recomendado.

Ensayos de con chip: preparación de muestras, microchips de marcaje y huellas dactilares

Se determinaron y analizaron perfiles de expresión de poblaciones de leucocitos activados y no activados utilizando chips de genes. El chip de oligonucleótidos Affymetrix GeneChip® a la medida permite el interrogatorio de aproximadamente 35.000 productos de transcripción de ARNm únicos.

Se aisló el ARN y el análisis de chip de genes se realizó como se describe (véase Henshall *et al.* (2003) *Cancer Research* 63:4196-4203; Henshall *et al.* (2003) *Oncogene* 22:6005-12; Glynne, *et al.* (2000) *Nature* 403:672-676; Zhao, *et al.* (2000) *Genes Dev.* 14:981-993).

• Purificar poli A⁺ ARNm a partir del ARN completo o limpiar el ARN completo con kit RNEASY® de Qiagen (purificación de poli A⁺ ARNm a partir de ARN completo)

La suspensión oligotex se calentó a 37°C y se mezcló inmediatamente antes de agregar al ARN. El tampón de elución se incubó a 70°C. Obsérvese que el 2 x tampón de unión puede calentarse hasta 65°C si hay precipitado en el tampón. El ARN completo se mezcló con agua tratada con DEPC, 2 x tampón de unión, y Oligotex según la Tabla 2 en la página 16 del Manual Oligotex. La mezcla se incubó durante 3 minutos a 65°C, y luego se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Los tubos se centrifugaron durante 2 minutos de 14.000 a 18.000 g. Obsérvese que si la centrifugadora tiene un "ajuste suave", debe utilizarse. Se eliminó el sobrenadante sin perturbar el sedimento de Oligotex. Una pequeña cantidad de solución puede dejarse atrás para reducir la pérdida de Oligotex. El sobrenadante se debe guardar hasta asegurarse que se ha producido la unión satisfactoria y la elución de poli A⁺ ARNm.

El sedimento se volvió a poner en suspensión suavemente en tampón de lavado OW2 y pipeteó sobre la columna de centrifugación. La columna de centrifugación se centrifugó a velocidad máxima (si es posible ajuste suave) durante 1 minuto.

Después de la centrifugación, la columna de centrifugación se transfirió a un nuevo tubo de recogida y se volvió a poner en suspensión suavemente en tampón de lavado OW2 y se centrifugó nuevamente como se describe en la presente memoria.

La columna de centrifugación se transfirió a un nuevo tubo y se eluyó con 20 a 100 μ l de tampón de elución precalentado (70°C). La resina Oligotex se volvió a poner en suspensión suavemente pipeteando arriba y abajo, y luego se centrifugó como anteriormente. El procedimiento de elución se repitió con tampón de elución reciente. De lo contrario, si es necesario un volumen de elución bajo, sólo puede utilizarse el primer eluido.

Se leyó la absorbancia, utilizando tampón de elución diluido como blanco.

• Precipitación con etanol

Antes de proceder con la síntesis de ADNc, se precipitó el ARNm. Algunos restos de componente o en el tampón de elución a partir del procedimiento de purificación Oligotex inhibirán reacciones enzimáticas corriente abajo del ARNm.

0,4 vol. de NH₄OAc 7,5 M + 2,5 vol. de etanol frío al 100% se añadió al eluido. La solución se precipitó a -20°C 1

hora hasta toda la noche (o 20 a 30 min. a -70°C). La solución precipitada se centrifugó entre 14.000 y 16.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El sedimento se lavó con 0,5 ml de etanol al 80% (-20°C) y luego se centrifugó entre 14.000 y 16.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El lavado con etanol al 80% se repitió una vez. El sedimento se seca en la campana. (No acelerar al vacío). El sedimento se puso en suspensión en DEPC H₂O a una concentración de 1 µg/µl.

• *Limpieza de ARN completo utilizando el kit RNeasy de Qiagen*

No más de 100 µg de ARN debe agregarse a una columna RNeasy. El volumen de la muestra se ajustó a 100 µl con agua sin ribonucleasa y 350 µl de tampón RLT, a continuación se añadieron a la muestra 250 µl de etanol (100%). La solución se mezcló mediante pipeteado (no centrifugar), a continuación la muestra se aplica a una minicolumna de centrifugación RNeasy. La minicolumna de centrifugación se centrifugó durante 15 segundos a >10.000 rpm. Si preocupa el rendimiento, la medición de flujo puede volver a aplicarse a la columna y se centrifuga de nuevo.

La columna se transfirió a un tubo de recogida nuevo de 2 ml, se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 segundos a >10.000 rpm. Se descartó el flujo a través. Se añadieron de nuevo 500 µl de tampón RPE a la minicolumna de centrifugación, y se centrifugó durante 15 segundos a >10.000 rpm. El flujo a través se descartó de nuevo, luego se centrifugó durante 2 min a velocidad máxima para secar la membrana de la columna. La columna se transfirió a un tubo de recogida nuevo de 1,5 ml y 30 a 50 µl de agua sin ribonucleasa se aplicaron directamente sobre la membrana de la columna. La columna se centrifugó durante 1 min a >10.000 rpm, y se repitió la elución.

Se tomó una lectura de la absorbancia. Si es necesario, el eluido se puede precipitar con acetato de amonio y 2,5 volúmenes de etanol al 100%.

• *Construcción de ADNc utilizando el kit "SUPERScript[®] Choice System for cDNA Synthesis" de Gibco*

• *Síntesis de la primera cadena de ADNc*

Se utilizaron como material de partida 5 µg de ARN completo o 1 µg de polyA⁺ ARNm. Para ARN completo, se utilizaron 2 µl de SUPERScript[®] RT (kit con transcriptasa inversa para la síntesis de ADNc) (para polyA⁺ ARNm, se utiliza 1 l de SUPERScript[®] RT). El volumen final de la mezcla de síntesis de la primera cadena debe ser de 20 µl. ARN debe estar en un volumen no mayor que 10 µl. El ARN se incubó con 1 µl de 100 pmol de T7-T24 oligo durante 10 min a 70°C. Se añadieron en hielo, 7 µl de: 4 µl 5 veces tampón de la 1ª cadena, 2 µl de DTT 0,1 M y 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 min, a continuación se añadió SUPERScript[®] RT.

La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora.

• *Síntesis de la segunda cadena*

Las reacciones de la 1ª cadena se colocaron en hielo.

A la mezcla se añadió:

- 91 µl de DEPC H₂O
- 30 µl 5x tampón de 2ª cadena
- 3 µl de mezcla dNTP 10 mM
- 1 µl 10 U/µl de ADN ligasa de *E. coli*
- 4 µl 10 U/µl de ADN polimerasa de *E. coli*
- 1 µl 2 U/µl de ribonucleasa H

Lo anterior se debe hacer en una mezcla si hay más de 2 muestras. La mezcla añadida se incubó durante 2 horas a 16°C.

Se añadieron 2 µl de T4 ADN polimerasa y se incubaron más durante 5 min a 16°C. Se añadieron 10 µl de EDTA 0,5 M para interrumpir la reacción.

• *Limpieza del ADNc*

El ADNc se limpió utilizando purificación en fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) en tubos de gel:

Los tubos con PLG (gel de bloqueo de fase) se centrifugaron durante 30 segundos a velocidad máxima, y se transfirió a un tubo nuevo PLG. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico y se agitó vigorosamente (sin vórtice). Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a velocidad máxima. La solución de la capa acuosa superior se transfirió a un nuevo tubo. La solución acuosa se precipitó con etanol mediante la adición

de 7,5 veces NH_4OAc 5 M y 2,5 veces el volumen de etanol al 100%. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a la temperatura ambiente durante 20 min, a máxima velocidad. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento se lavó 2 veces con etanol frío al 80%. Se elimina tanto etanol como sea posible y luego se deja secar al aire el sedimento. El sedimento se volvió a poner en suspensión en 3 μl de agua sin ribonucleasa.

• *Transcripción in vitro (TIV) y marcaje con biotina*

Se pipetearon 1,5 μl de ADNc en un tubo de pared delgada de RCP. se añadió mezcla de marcaje NTP a temperatura ambiente al tubo de RCP.

Mezcla de marcaje NTP:

2 μl	T7 10xATP (75 mM) (Ambion)
2 μl	T7 10xGTP (75 mM) (Ambion)
1,5 μl	T7 10xCTP (75 mM) (Ambion)
1,5 μl	T7 10xUTP (75 mM) (Ambion)
3,75 μl	10 mM Bio-11-CTP
0,75 μl	10 mM Bio-16-UTP
2 μl	10x tampón de transcripción T7 (Ambion)
2 μl	10x mezcla de enzimas T7 (Ambion)

El volumen final de la reacción total fue de 20 μl . Los tubos se incubaron durante 6 horas a 37°C en una máquina de RCP.

Limpieza del producto TIV con RNeasy

Véase más arriba el procedimiento.

El ARNc marcado se precipita con etanol y se vuelve a poner en suspensión en un volumen compatible con la etapa de fragmentación.

Fragmentación

Se fragmentaron aproximadamente 15 μg de ARN marcado utilizando la técnica siguiente. El volumen de reacción de fragmentación se redujo al mínimo a aproximadamente 10 μl de volumen, pero no más de 20 μl , debido a problemas de precipitación de magnesio con el tampón de hibridación.

El ARN se fragmentó por incubación a 94°C durante 35 minutos en 1 x tampón de fragmentación.

5 x tampón de fragmentación:

Tris-acetato 200 mM, pH 8,1
KOAc 500 mM
MgOAc 150 mM

El transcrito de ARN marcado se analizó antes y después de la fragmentación. Las muestras se calentaron a 65°C durante 15 minutos y se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1%/TBE para tener una idea aproximada del intervalo de tamaño del producto de transcripción.

• *Matriz de microchip*

La matriz de microchip EOS HuO3 utilizada en todos los experimentos es una matriz de oligonucleótidos personalizado AFFYMETRIX GENECHIP® de costumbre que comprende 59.680 juegos de sondas que representan de 46.000 secuencias únicas que incluyen tanto exones conocidos como FGENESH predichos que estaban basados en el primer borrador del genoma humano. Los juegos de sondas HuO3 consisten en sondas iguales perfecta sólo, teniendo la mayoría de juegos de sondas 6 ó 7 sondas.

• *Hibridación en la matriz de microchip*

Se pipetearon en el chip 200 μl (10 μg de ARNc) de mezcla de hibridación. Si van a hacerse múltiples hibridaciones (tales como el ciclo a través de un conjunto de 5 chips), entonces se recomienda hacer una mezcla de hibridación inicial de 300 l o más.

Mezcla de hibridación: ARN marcado fragmentado (50 ng/ μl de conc. final)

50 pM 948-b control oligo

1,5 pM BioB
5 pM BioC
25 pM BioD
100 pM CRE
0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque
0,5 mg/ml de ASB acetilado
a 300 µl con 1x tampón de hibridación MES

Las señales de hibridación se visualizaron utilizando estreptavidina conjugada con ficoeritrina.

• *Normalización de los datos de expresión génica*

Los datos de expresión génica se normalizaron ajustando los datos de intensidad de la sonda de nivel de cada matriz a una distribución de χ^2 fija, utilizando una función y inversa para cartografiar la distribución empírica acumulada de intensidades para la distribución y deseada. Este procedimiento es similar a otros procedimientos de normalización por chip, tales como la fijación de la media y la desviación estándar de cada chip a un valor estándar, excepto que es más estricta porque fija toda la distribución de intensidades en lugar de uno o dos parámetros. La finalidad de la normalización por chip es eliminar variaciones entre chips, en el supuesto de que es atribuible a los factores no biológicos, es decir, ruido técnico. El parámetro de escala para la distribución se seleccionó para dar una distribución con un valor medio arbitrario de 300, y el parámetro de forma de 0,81 se seleccionó para reproducir la forma típica de la distribución empírica observa en las muestras buenas.

Para cada juego de sondas se calculó una sola medida de la intensidad media utilizando la trimean de Tukey de la intensidad de las sondas de constituyentes. La trimean es una medida de tendencia central que es resistente a los efectos de los valores atípicos. Por último, se aplicó una sustracción de fondo a cada medida de intensidad media para corregir la hibridación inespecífica. La medición de la intensidad media de un juego de sondas "nulo" que consiste en 491 juegos de sondas con secuencia codificada se sustrajo de todos los demás juegos de sondas en el chip.

Etiquetado del protocolo proporcionado en la presente memoria

Reacción de hibridación:

Se comienza con el TIV no biotinilado (purificado en columnas RNeasy)

(véase el ejemplo 1 para las etapas de tejido para TIV)

TIV de cadena complementaria de ARN; 4 µg:	µl
Hexámeros aleatorios (1 µg/µl):	4 µl
H ₂ O:	µl
Volumen Total:	14 µl

Incubar a 70°C, 10 min. Se coloca en hielo.

Transcripción inversa:

5 veces tampón de la primera cadena (BRL):	6 µl
DTT 0,1 M:	3 µl
50 veces mezcla de NTPd:	0,6 µl
H ₂ O:	2,4 µl
Cy3 o Cy5 UTPd (1 mM):	3 µl
SS RT II (BRL):	1 µl
Volumen total:	16 µl

- Añadir a la reacción de hibridación.
- Incubar 30 min., 42°C.
- Añadir 1 µl SSII y se continúa una hora más.

Se coloca en hielo.

- 50 veces mezcla de dNTP (25 mM de dATP, dCTP, y dGTP fríos, 10 mM de dTTP: 25 µl de cada uno de 100 mM de dATP, dCTP, y dGTP; 10 µl de 100 mM de dTTP a 15 µl de H₂O)

Degradación del ARN:

- Se añaden 1,5 l de NaOH 1 M/EDTA 2 mM, se incuba a 65°C, 10 min.

H₂O 86 µl
NaOH 10N 10 µl
EDTA 50 mM 4 µl
U-Con 30

500 µl de TE/muestra se centrifugan a 7000g durante 10 minutos, excepto flujo a través para purificación

Purificación Qiagen:

- se pone en suspensión material u-con recuperado en 500 µl de tampón PB
- se procede con el protocolo normal Qiagen

Se digiere con desoxirribonucleasa:

- Se añade 1 µl de dil 1/100 de DNAsa/30 µl Rx y se incuba a 37°C durante 15 min.
- 5 min a 95°C para desnaturalizar la enzima

Preparación de la muestra:

- Se añade:

Cot-1 ADN: 10 µl
50 veces NTPd: 1 µl
20 veces SSC: 2,3 µl
pirofosfato Na: 7,5 µl
10 mg/ml de ADN de esperma de arenque 1 µl de dilución 1/10
Volumen final: 21,8 µl

- Secado en Speed Vac. (evaporador centrífugo)
- Se vuelve a poner en suspensión en 15µl de H₂O.
- Se añaden 0,38 l de SDS al 10%.
- Se calienta a 95°C, 2 min.
- Se enfría lentamente a temp. ambiente durante 20 min.

Se coloca en extensiones y se hibridan durante la noche a 64°C.

Lavado después de la hibridación:

3 veces SSC/0,03% SDS: 2 min. 37,5 ml 20 veces SSC + 0,75 ml de SDS al 10% en 250ml de H₂O
1 vez SSC: 5 min. 12,5 ml 20 veces SSC en 250ml de H₂O
0,2 veces SSC: 5 min. 2,5 ml 20 veces SSC en 250 ml de H₂O

Se secan las extensiones en la centrifugadora, 1000 RPM, 1 min.

Se exploran en las posiciones apropiadas del tubo fotomultiplicador y los canales de fluorescencia.

CS1 se sobreexpresa en leucocitos, pero no en varios tipos de tejidos no linfoides

Para evaluar el perfil de expresión de CS1, se analizó por RCP en tiempo real ARNm aislado de leucocitos y otros tejidos. Los resultados indican que el nivel de expresión de ARNm era mucho mayor en leucocitos que la de la mayoría de los otros tejidos adultos normales. Otros tejidos adultos normales que no mostraron expresión de CS1 superior a los niveles de referencia incluían tejido adiposo, glándulas suprarrenales, la aorta, válvula aórtica, apéndice, arteria coronaria, vejiga, hueso, médula ósea, mama, bronquios, cuello del útero, cerebro, médula espinal, diafragma, endometrio, epidídimo, esófago, vesícula biliar, ganglios, corazón, laringe, labio, hígado, pulmón, músculo, el miometrio, nervio vago, epiplón, mucosa oral, ovario, páncreas, paratiroides, mucosa faríngea, placenta, próstata, retina, glándula salival, piel, estómago, membrana sinovial, testículos, timo, tiroides, lengua, tráquea, cordón umbilical, uréter, útero, vagina, o vena. ARNm de CS1 se expresó en muestras seleccionadas de colon (2/11), riñón (1/20), intestino delgado (1/3), bazo y amígdalas (2/4). Los resultados indicaron que CS1 se expresa principalmente en leucocitos y debe ser una buena diana para las enfermedades autoinmunitarias.

La expresión de CS1 aumenta en muchas poblaciones de leucocitos activados

Para evaluar la correlación entre la expresión de CS1 y la activación de leucocitos, se analizó la expresión de ARNm de CS1 en muchas poblaciones de leucocitos activados y no activados. Los resultados indican que la expresión de CS1 aumentó en las linfocitos B activados, las células DC maduras, las células CD3 activadas (aumento de bajo a

moderado), las células CD4 activadas (aumento de nivel bajo), y las células CD8 activadas (aumento de bajo a moderado, en función del donante) en comparación con sus correspondientes poblaciones de referencia no activadas. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de CS1 se correlaciona con la activación de varios subconjuntos de leucocitos.

Ejemplo 3: Producción de antígenos para generar anticuerpos monoclonales contra CS1

Clonación:

El dominio extracelular (ECD) de CS1 humana se aisló de células Raji utilizando cebadores que flanquean el dominio extracelular de CS1 (DEC CS1). El producto de RCP se purificó en gel y se ligó en un vector que codifica la región constante de IgG3 (Fc- γ 3 humana). El plásmido que contiene DEC CS1-Fc γ 3 se purificó a gran escala y se confirmó por secuenciación de ADN.

Transfección estable de DEC CS1-Fc γ 3:

Se linealizaron 50 g de DEC CS1-Fc γ 3 plásmido con la enzima Fsp1, y el ADN se precipitó en etanol, se lavó y se volvió a poner en suspensión en 500 μ l de PBS estéril. Las células NSO se lavaron dos veces en PBS frío, y se volvieron a poner en suspensión a 2×10^7 por ml de PBS. Para la transfección se utilizó una cantidad de 1×10^7 células.

Se combinaron 500 μ l de células NSO con 500 μ l de ADN en PBS. Las células se electroporaron a 1,5 V y 3 μ F con un pulsador Gene de BioRad. Las células se añadieron a 100 ml de medio DMEM completo y se sembraron en diez placas de 96 pocillos. Se añadió medio de selección micofenólica a 1 μ g/ml 24 horas después de la transfección. Los transfectantes positivos se detectaron después de 10 días y se expandió en placas de 48 y 24 pocillos. Los transfectantes positivos se volvieron a detectar y los productores de alta fueron ampliados para la purificación de proteínas.

Purificación de proteínas DEC CS1-Fc γ 3:

Los transfectantes estables que expresan la proteína de fusión DEC CS1 Fc γ 3 se expandieron en 600 ml de medio DMEM completo con aditivos de glucosa durante cinco días. La proteína de fusión se purificó en una columna de proteína G Sepharose y se dializó contra 1x PBS. Las formas reducidas y no reducidas de DEC CS1-Fc γ 3 se analizaron por Coomassie. DEC CS1 Fc γ 3 también se analizó por inmunotransferencia Western utilizando anticuerpos anti-HulG, y se confirmó por secuenciación N-terminal. El proteína de fusión CS1-Fc- γ 3 purificada se utilizó para inmunizar ratones.

Producción de la proteína de fusión DEC CS1-myc-GPI:

El dominio extracelular (DEC) de CS1 humana se aisló de células Raji utilizando cebadores que flanquean el dominio extracelular de CS1. El producto de RCP se purificó en gel y se ligó en un vector que expresaba una etiqueta myc y el enlace glucosil fosfatidilinositol para la expresión de la superficie celular (myc-vector GPI). El plásmido que contenía DEC CS1-myc-GPI se purificó a gran escala y se confirmó por secuenciación de ADN.

Transfección estable de DEC CS1-myc-GPI:

50 μ g de plásmido DEC CS1-myc-GPI se linealizó con la enzima de Fsp1, y el ADN se precipitó en etanol, se lavó y se volvió a poner en suspensión en 500 μ l de PBS estéril. Las células NSO se lavaron dos veces en PBS frío y se volvieron a poner en suspensión a razón de 2×10^8 por un ml de PBS. Para la transfección se utilizó una cantidad de 1×10^8 células.

Se combinaron 500 μ l de células NSO con 500 μ l de ADN en PBS. Las células se electroporaron a 1,5 V y 3 μ F con un pulsador Gene de Biorad. Las células se cultivaron a 37°C en CO₂ al 5% con 1 μ g/ml de selección micofenólica, y se subclonaron posteriormente en placas de 96 pocillos. Los transfectantes positivos se detectaron con anticuerpo anti-myc. Se seleccionaron buenos productores de transfectantes de DEC CS1-myc-GPI y se expandieron por ensayos *in vitro*.

Ejemplo 3: Producción de anticuerpos monoclonales anti-CS1

Inmunógenos para CS1 humana:

La proteína de fusión DEC CS1- γ 3 humana recombinante purificada se utilizó para inmunizar ratones Balb/c en las almohadillas de las patas (DEC CS1 se refiere al dominio extracelular de CS1 descrito anteriormente). En resumen, los ratones se inmunizaron en las almohadillas de las patas traseras con 10 μ g de proteína con un volumen igual de adyuvante de Ribi en un volumen total de 25 μ l. Las inmunizaciones de las almohadillas de las patas se realizaron 4 veces en intervalos de 4 ó 5 días.

a. Fusión celular:

Se sacrificaron dos ratones inmunizados con DEC CS1-γ3. Se extrajeron de los ratones los ganglios linfáticos poplíteos femoral y sacro. Se aislaron linfocitos de los tejidos, y los hibridomas se generaron por procedimientos estándar. En resumen, se generaron hibridomas por fusión en la que interviene polietilenglicol (PEG) 1500 entre linfocitos y una estirpe celular de mieloma murino (células NSO). Las células fusionadas se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^7 células por placa. La selección de células fusionadas se realizó utilizando medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina).

b. Detección de hibridomas

La especificidad de los anticuerpos segregados por los hibridomas se determinó mediante un ensayo de unión basado en citometría de flujo (por sus siglas en inglés, FACS) a células que expresan CS1. El ensayo FACS se llevó a cabo utilizando protocolos estándar. Los transfectantes estables NSO que expresa dominio extracelular de CS1 de la superficie (2×10^5) se volvieron a poner en suspensión en 50 µl de PBS enfriado en hielo con 50 µl de sobrenadante del cultivo de hibridoma en hielo durante 1 hora. Después de un extenso lavado, las células se incubaron con anticuerpos específicos de IgG anti-ratón en cabra conjugados con ficoeritrina durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron de nuevo y los anticuerpos unidos a la superficie celular se detectaron con FACS utilizando un FACScan de Becton Dickinson. Como se muestra en la Tabla 1, los anticuerpos: Luc2, Luc3, Luc15, Luc20, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63 o Luc90, se unieron fuertemente a las células NSO-CS1 transfectadas con CS1, pero no a NSO-FcRn. Los anticuerpos CS1 anti-humanos se unieron a las células K562 y Daudi (que se sabe que expresan CS1 natural), pero no a las células Jurkat de control negativo. Los datos demuestran que los anticuerpos anti-CS1 producidos son capaces de unirse específicamente a CS1. Además se muestran en la tabla los resultados del ensayo (por ELISA) de unión de anticuerpos Luc a la proteína de fusión CS1-γ3 en comparación con la referencia negativa AR-G3 (proteína de fusión γ3). Los anticuerpos Luc se unen específicamente a CS1-γ3 y no a la proteína de fusión AR-γ3 con referencia negativa.

Tabla 1. MAB anti-CS1 humana generados en la fusión 342

	Resultados			FACS (MFI)			ELISA (captura)			
	MAB	NSO-CS1	NSO-FcRn	K562	Daudi	Jurkat	CS1-G3	AR-G3	Subclones	Ig de ratón ISO
1	Luc2	162	<5	13.4	10.5	<5	1.0	0.2	Luc2-1	IgG1
2	Luc3	377	<5	25.7	7.8	<5	0.9	0.5	Luc3-F	IgG1, G2b
3	Luc15	110	<5	14.0	12.4	<5	1.1	0.3	Luc15-1	ND
4	Luc20	89	<5	8.0	12.6	<5	1.2	0.2	Luc20-1	ND
5	Luc22	228	<5	14.7	6.1	<5	0.6	0.2	Luc22-1	IgG2b
6	Luc23	164	<5	19.6	10.2	<5	0.6	0.2	Luc23-1	IgG1
7	Luc29	86	<5	24.1	11.9	<5	0.9	0.2	Luc29-D6, C8	IgG1
8	Luc32	201	<5	9.8	10.7	<5	0.8	0.2	Luc32-1	IgG2b
9	Luc34	127	<5	26.2	10.3	<5	1.2	0.3	Luc34-1, 34-3	IgG1
10	Luc35	184	<5	10.6	29.7	<5	0.7	0.2	Luc35-1	IgG2a
11	Luc37	366	<5	12.8	7.2	<5	0.6	0.2	Luc37-C12,F11	IgG2b
12	Luc38	112	<5	31.4	11.6	<5	0.8	0.2	Luc36-1	IgG2b
13	Luc39	117	<5	12.0	17.5	<5	0.4	0.2	Luc39-E10	IgG2a
14	Luc56	132	<5	12.6	9.7	<5	1.0	0.2	Luc56-1	IgG2a
15	Luc60	230	<5	14.6	10.4	<5	0.9	0.3	Luc60-2	IgGb
16	Luc63	214	<5	15.8	12.7	<5	0.6	0.2	Luc63-1	IgG2a
17	Luc90	237	<5	9.7	10.1	<5	0.8	0.1	Luc90-H1, D9	IgG2b
	Referencia ISO	14	3	5.41	6.02	<5	0.16	0.14		
	Anti-Myc	193	335	6.62	6.85	<5	0.19	0.15		

Secuencias de aminoácidos de los anticuerpos anti-CS1 monoclonales producidos

Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se clonaron utilizando técnicas convencionales. En resumen, el ARN completo de $1-5 \times 10^6$ células se utilizó para preparar ADNc utilizando un kit SMART RACE ADNc Amplification (BD Biosciences Clontech) y las regiones variables se ampliaron por RCP utilizando cebadores específicos de genes complementarios a las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de ratón.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada madura y la cadena ligera madura de los anticuerpos Luc90, Luc63, y Luc34 se muestran en la Tabla 4, que proporciona secuencias de aminoácidos de la región variable de

cadena pesada (SEC. ID. nº 3) y la región variable de cadena ligera (SEC. ID. nº 4) de Luc90; las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 5) y la región variable de la cadena ligera (SEC. ID. nº 6) de Luc63; y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 7) y la región variable de cadena ligera (SEC. ID. nº 8) de Luc34. Las SEC. ID. nº 9, nº 10 y nº 11 representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc90. Las SEC. ID. nº 12, nº 13 y nº 14 representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc90. Las SEC. ID. nº 15, nº 16, y nº 17 representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc63. Las SEC. ID. nº 18, nº 19 y nº 20, representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc63. Las SEC. ID. nº 21, nº 22 y nº 23, representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc34. Las SEC. ID. nº 24, nº 25 y nº 26 representan las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc34.

Tabla 4: Secuencias de aminoácidos de anticuerpos de CS1Luc-90 VH-SEC ID nº:3

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTTYWMNWVKQRPQGLEWIGMIHPDSETRLNQ
 SEC ID nº: 9 SEC ID nº: 10
 KFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQGTSTVTVSS
 SEC ID nº:11

Luc-90 VL-SEC ID nº:4

DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF
 SEC ID nº:12 SEC ID nº:13
 TGSGSGTDFTFTISNVQAEDLAVYYCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
 SEC ID nº:14

Luc-63 VH-SEC ID nº:5

EVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYSWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSSTINYTP
 SEC ID nº:15 SEC ID nº:16
 SLKDKFIIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYFDVWGAGTTVTVSS
 SEC ID nº:17

Luc-63 VL-SEC ID nº:6

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIABAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRF
 SEC ID nº:18 SEC ID nº:19
 TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGTKLEIK
 SEC ID nº:20

Luc-34 VH-SEC ID nº:7

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQ
 SEC ID nº: 21 SEC ID nº:22
 KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGKVYYGSNPFAYWGQGTTLTVTSA
 SEC ID nº:23

Luc-34 VL-SEC ID nº:8

DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNLAWYQQKPGNAPRLISGATSLETGVPSRF
 SEC ID nº: 24 SEC ID nº: 25
 SGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFFGGGTKLEIK
 SEC ID nº: 26

Ejemplo 4: Caracterización de Anticuerpos CS1

Se utilizó un ensayo de competencia de citometría de flujo para determinar la especificidad del epítipo de 15 anticuerpos anti-CS1 monoclonales diferentes. Transfectantes estables de NSO que expresan CS1 de la superficie (2×10^5) se incubaron en hielo durante 1 hora con 50 μ l de anticuerpos anti-CS1, incluyendo combinaciones por pares de Luc23, Luc29 Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc 63 y Luc 90. En paralelo, el anticuerpo de control de isotipo (AIP-13) se utilizó como referencia negativa. Anticuerpos anti-CS1 monoclonales biotinilados (Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63 y Luc90) se incubaron a 1 μ g/ml con la mezcla de células/anticuerpos durante 30 minutos más en hielo. Después de un largo lavado, se incubaron las células con estreptavidina conjugada con ficoeritrina durante 1 hora en hielo. Se lavaron las células y se detectaron anticuerpos biotinilados unidos a la superficie celular por FACS utilizando un FACScan de Becton Dickinson.

Se probó la capacidad de los anticuerpos sin marcar: Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63 y Luc90 para competir con cada uno de los demás a una concentración de 15 μ g/ml, 3 μ g/ml y 0,6 μ g/ml, y se añadieron anticuerpos de competencia o de bloqueo a 1 g/ml. Se utilizó AIP-13 como referencia negativa, ya que este anticuerpo no se une a CS1 ni compete con ninguno de los anticuerpos Luc. Una disminución significativa en la MFI indicaba la competencia por CS1 de la superficie celular por anti-CS1 biotinilado por Mab frente a Mab anti-CS1 sin marcar, por al menos 50% en comparación con el MFI del anticuerpo de control.

Los ensayos de competencia indicaron que varios de los anticuerpos Luc se ponen en contacto con epítipos distintos. Luc38 se pone en contacto con un epítipo distinto de los epítipos Luc37, 23, 90 y 63. Luc63 se pone en contacto con un epítipo separado, que no se superpone que es distinto de los epítipos Luc37, 23, 90 y 38. Luc90 se pone en contacto con un epítipo diferente, que no se superpone, distinto de los epítipos Luc 37, 23, 63 y 38. Luc 23 se pone en contacto con otro epítipo que no se superpone, distinto de los epítipos Luc90, 63 y 38. Luc37 se pone en contacto con epítipos adicionales que no se superponen, distintos de los epítipos contactados por Luc90, 63 y 38. Luc63 se pone en contacto con un epítipo que se superpone con Luc34, mientras que Luc90 se pone en contacto con un epítipo que se superpone con Luc34. Luc37 se pone en contacto con un epítipo que se superpone con el epítipo de Luc23. Luc34 bloquea o disminuye significativamente la unión de todos los anticuerpos Luc, y puede entrar en contacto con un epítipo amplio, expuesto o puede tener una mayor afinidad por CS1. Luc37, Luc23 y Luc38 no bloquean la unión a CS1 por el anticuerpo Luc34. Los epítipos de Luc37, Luc23 y Luc38 se pueden "enterrar" dentro de la estructura secundaria de CS1, o la afinidad por CS1 puede ser menor que la afinidad del anticuerpo Luc34.

Las afinidades relativas de los tres anticuerpos monoclonales se ensayaron también mediante análisis Biacore. El análisis cinético de los Mab de CS1 por mediciones SPRKinetics entre la proteína de fusión CS1-Fc humana y anticuerpos Luc34.1, 63.2 y 90H1 anti-humanos monoclonales de ratón de CS1 se realizaron utilizando BIAcore 2000 (BIAcore, Suecia). La condición de regeneración se comprobó inmovilizando más de 10.000 UR de cada anticuerpo en células de flujo diferentes e inyectando de CS1-Fc sobre la superficie, seguido de pruebas de una serie de tampones diferentes hasta que se encontró el mejor para optimizar la eliminación de CS1-Fc de cada anticuerpo. Un tampón de glicina 10 mM, pH 2,0 resultó ser el tampón de regeneración óptima y se probó inmediatamente su reproducibilidad a lo largo de 10 ciclos de inyección de CS1-Fc y regeneración del tampón. El tampón resultó ser adecuado para la regeneración reproducible de la superficie del anticuerpo. Por lo tanto glicina 10 mM a pH 2,0 fue el tampón de regeneración designado para los experimentos de BIAcore con CS1-Fc y anticuerpos.

El anticuerpo de CS1 producidos internamente se inmovilizó con unidades de respuesta baja (RU) que oscilan entre 99,4 y 133,7 RU en el chip con detector CM5 calidad Investigación por reactivos de acoplamiento de aminas BIAcore (N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-hidroxisuccinimida, NHS y etanolamina HCl, pH 8,5). Los ensayos se realizaron a un caudal de 30 μ l/min a temperatura ambiente. Una fase de asociación de tres minutos de CS1-Fc fue seguida de diez minutos de inyección de tampón corriente (Hepes 10 mM, cloruro sódico 300 mM, EDTA 3 mM, P-20 al 0,05%, pH 7,4) para controlar la disociación para cada ciclo de unión, con diferentes concentraciones de CS1-Fc por ciclo. La superficie de la regeneración se regeneró con glicina 10 mM, pH 2,0. La cinética de unión de cada par CS1-Fc y anticuerpo se calculó a partir de un análisis global de los datos del sensorgrama recogidos doce concentraciones diferentes de CS1-Fc (1024 nM, 512 nM, 256 nM, 128 nM, 64 nM, 32 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM) por duplicado, utilizando el programa BIAevaluate. Se aplicó doble marcado en cada análisis para eliminar las respuestas de fondo de la superficie de referencia y tampón solamente de referencia. La afinidad (K_D) de la unión se obtuvo ajustando simultáneamente las fases la asociación y de disociación del sensograma de la serie de concentración de analitos utilizando el modelo de analito bivalente del programa informático BIAevaluate. El experimento se realizó tres veces para estudiar la desviación estándar de los datos.

Las afinidades de unión de Luc 90.H1, Luc63.2, y Luc34.1 se resumen a continuación. Luc90.H1 tiene la mayor afinidad de unión entre estos tres anticuerpos. La afinidad de unión de Luc90.H1 es 5,5 veces mayor que la de Luc 63,2 y 28 veces mayor que la de Luc34.1.

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Luc 90.H1	4,56e4	2,81e-4	6,29e-9 +/- 2,06e-9

Luc63.2	8,71e3	3,01e-4	3,46e-8 +/- 8,86e-9
Luc34.1	7,48e3	1,27e-3	1,73e-7 +/- 3,46e-8

Tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CS1:

Las células transfectadas con CS1 se examinaron también por tinción inmunohistoquímica con anticuerpos anti-CS1. Una cantidad de 10 µg/ml de anticuerpo anti-CS1 monoclonal primario se añadió a las células transfectadas con CS1. Las células se bloquearon entonces con suero y se incubaron con la biotina anti-ratón-Ig. Se mezcló a continuación avidina-peroxidasa con las células y se reveló con AEC (reactivo de peroxidasa patrón). El color rojo de AEC indicaba tinción positiva, mientras que los núcleos de las células ensayadas se tiñeron por contraste con hematoxilina (azul). Los datos indicaron que las células transfectadas con CS1 se tiñeron positivamente con los anticuerpos anti-CS1 Luc 23, Luc 38 y Luc 63, demostrando que los anticuerpos anti-CS1 producidos son capaces de unirse a CS1 expresada en la superficie celular. Así pues, los anticuerpos anti-CS1 son adecuados para su utilización no sólo en la detección de la expresión en la superficie de células de la sangre periférica en solución, sino también en la detección por inmunohistoquímica (IHQ), que se utiliza normalmente para analizar secciones de tejido (por ejemplo, ganglios linfáticos o biopsias de tejido de pacientes).

La tinción inmunohistológica de amígdalas inflamadas se ilustró con dos anticuerpos anti-CS1, Luc90 y Luc63. La tinción con CD138 tiñe células plasmáticas y células epiteliales. En el patrón de superposición de la tinción, es evidente que anticuerpos de CS1 tiñen las células plasmáticas en las amígdalas inflamadas.

La tinción inmunohistoquímica de tejido sinovial de la articulación de un paciente con artritis reumatoide se demostró con anti-CS1 Luc63. Las células plasmáticas se han infiltrado en la membrana sinovial como se ve mediante la tinción con CD138. En el patrón de superposición de la tinción, es evidente que los anticuerpos anti-CS1 tiñen células de plasma en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide.

Estos resultados indican que las células plasmáticas que expresan CS1 estaban presentes tanto en las amígdalas inflamadas como en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide, lo que sugiere la utilización viable de anticuerpos anti-CS1 en el tratamiento de estas enfermedades.

Modelo de expresión de la proteína CS1:

La expresión de la proteína CS1 se examinó más con los anticuerpos Luc producidos por análisis FACS. Se aislaron CMSP de individuos sanos y de pacientes de lupus por un procedimiento de centrifugación en gradiente Ficoll Hypaque estándar. Se tiñeron CMSP con anticuerpos como se indica siguiendo procedimientos estándar. Para la activación con mitógeno de hierba carmín (PWM) de las CMSP, se añadió PWM a una dilución 1:100 a las CMSP, que se colocaron posteriormente a 37°C en CO₂ al 7% durante 8 días. Se recogieron células estimuladas con PWM y se lavaron antes de la tinción del anticuerpo. Los anticuerpos anti-CS1 de ratón utilizados en la presente memoria son Luc90 (IgG_{2b}) Luc63, Luc38 y otros anticuerpos anti-CS1 Luc producidos. Los anticuerpos de control de isotipo eran anticuerpos IgG de ratón del mismo isotipo.

Los resultados indicaron que CS1 se expresó positivamente en linfocitos B activados, linfocitos CD8⁺ T (tanto activados como vírgenes), células NK (CD3-CD56⁺), células NKT (CD56⁺CD3⁺), CD14^{+/0} leucocitos (monocitos y/o macrófagos) y linfocitos T CD4⁺ (nivel bajo en células activadas *in vitro*). CS1 se expresó en estas poblaciones de células tanto de adultos sanos como de pacientes con lupus. Se detectó la expresión de la proteína CS1 no significativa en linfocitos T CD4⁺ no activados en adultos sanos, plaquetas, células HuVEC, células de riñón, células de las vías respiratorias bronquiales, células pequeñas de las vías respiratorias, células de próstata, células hepáticas y células de mama.

La tinción de linfocitos B activados se muestra por tinción de CMSP activadas por PWM, mientras que la tinción de control de isotipo y las CMSP inactivadas se mostró como fondo fluorescente. El patrón de expresión de CS1 es significativo, debido a que un anticuerpo terapéutico ideal se une principalmente a células diana y no se une a otras células y tejidos, especialmente plaquetas. Los datos sugieren anticuerpos que los anti-CS1 son anticuerpos terapéuticos candidatos adecuados.

Ejemplo 5: Humanización de anticuerpos de CS1

Este ejemplo describe la humanización del anticuerpo Luc63 anti-CS1 monoclonal murino (MuLuc63). La humanización de MuLuc63 se llevó a cabo esencialmente según el procedimiento de Queen, C. *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 10029-10033 (1989)). En primer lugar, se identificaron segmentos VH y VL humanos con alta homología a las secuencias de aminoácidos de VH y VL de MuLuc63, respectivamente. A continuación, las secuencias de CDR junto con aminoácidos del marco importantes para mantener las estructuras de las CDR se injertaron en las secuencias marco humanas seleccionadas. El anticuerpo monoclonal humanizado resultante (HuLuc63) se expresó en la estirpe celular NS0 de mieloma de ratón. El anticuerpo HuLuc63 humanizado se unió a CS1 humana recombinante en un ensayo ELISA con un valor de EC₅₀ de 70,1 ng/ml, similar al valor de EC₅₀ de 66,1 ng/ml determinado para MuLuc63 en el mismo ensayo, lo que indica que HuLuc63 conservó alta afinidad de

unión para CS1 humana.

Clonación y secuenciación de los ADNc de la región variable de MuLuc63

5 Se extrajo ARN completo de aproximadamente 5×10^7 células de hibridoma productoras de MuLuc63 utilizando el reactivo TRIzol (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se sintetizó ADNc bicatenario utilizando el kit de ampliación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del proveedor. Los ADNc de la región variable de las cadenas pesada y ligera se ampliaron por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizando cebadores 3' que hibridan respectivamente a las regiones C de las cadenas gamma y kappa de ratón y un
10 cebador 5' universal proporcionado en el kit de ampliación de ADNc SMART RACE. Para RCP de la VH, el cebador 3' tiene la secuencia 5'-AGCTGGGAAGGTGTGCACAC-3'. Para la RCP de VL, el cebador 3' tiene la secuencia 5'-TTCAGTCCCATCAATCTTCC-3'. Los ADNc de VH y VL se subclonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para la determinación de la secuencia. La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante reacciones de secuenciación de ciclo de RCP con terminadores de cadena didesoxi fluorescente (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante.

Se secuenciaron cuatro clones de plásmidos por cada una de las cadenas pesada y ligera. Se identificaron secuencias homólogas únicas a las regiones variables de cadena pesada y ligera típicas de ratón. Las secuencias de ADNc junto con las secuencias de aminoácidos deducidas de las regiones V de cadena pesada y ligera de MuLuc63 se muestran en las Tablas 5 y 6.

La Tabla 5 proporciona secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 27) y de la región variable de la cadena ligera (SEC. ID. nº 28) de Luc 63, incluyendo las respectivas secuencias de péptido señal (SEC. ID. nº 29 y nº 34). Las SEC. ID. nº 30-32 y nº 35-37 representan CDR de la región variable de cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente. La SEC. ID. nº 33 representa la única mutación de aminoácidos, de NYT a NYA (en cursiva), en CDR2 de la región variable de cadena pesada de Luc 63.

Tabla 5: Supuesto punto de glucosilación de la región variable de cadena pesada de Luc63 anti-CS1

Luc-63 VH (SEC ID nº: 27)

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKG
SEC ID nº:29 SEC ID nº:30

LEWIGEINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNANTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYF
SEC ID nº:31 SEC ID nº:32

DVWGAGTTVTVSS



NYA (SEC ID nº:33)

Luc-63 VL (SEC ID nº:28)

METHSQVFVYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIAV
SEC ID nº:34 SEC ID nº:35

AWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYF
SEC ID nº:36

CQQYSSYPYTFGGGTKLEIK
SEC ID nº:37

La Tabla 6 proporciona secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada Luc 63 de ratón (SEC. ID. nº 38), de la secuencia marco de la región variable de la cadena pesada humana (SEC. ID. nº 39), ADNc de JH1 humano (SEC. ID. nº 40) y región variable de la cadena pesada de Luc 63 humanizada (SEC. ID. nº 41). También se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de ratón (SEC. ID. nº 42), del marco de la región variable de cadena ligera humana (SEC. ID. nº 43) y de la región variable de la cadena ligera de Luc 63 humanizada (SEC. ID. nº 44).

TABLA 6: Humanización de Luc63 (NYA)

VH de MuLuc-63	EVKLLS	GGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFS	<u>RYWMS</u>
ADNc de VH humana	EVQLVES	GGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS
VH de HuLuc-63	EVQLVES	GGGLVQPGGSLRLS	CAASGFDFS
VH de MuLuc-63	WVRQAPGK	GLEWIG	<u>EINPDSSTINYTPSLKD</u>

ADNc de VH humana	WVRQAPGKGLEWVA
VH de HuLuc-63	WVRQAPGKGLEWIG <u>EINPDSSTINYAPSLKD</u>
VH de MuLuc-63	KFIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCAR
ADNc de VH humana	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
VH de HuLuc-63	<u>KFIISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR</u>
VH de MuLuc-63	<u>PDGNYWYFDV</u> WGAGTTVTVSS
ADNc de VH humana	
VH de HuLuc-63	<u>PDGNYWYFDV</u> WGQGTTLTVSS
VH de MuLuc-63	<u>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC</u> <u>KASQDVGIAVA</u>
ADNc de VH humana	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC
VH de HuLuc-63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>KASQDVGIAVA</u>
VH de MuLuc-63	WYQQKPGQSPKLLIY <u>WASTRHT</u>
ADNc de VH humana	WYQQKPGKVPKLLIY
VH de HuLuc-63	WYQQKPGKVPKLLIY <u>WASTRHT</u>
VH de MuLuc-63	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC
ADNc de VH humana	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
VH de HuLuc-63	GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYC
VH de MuLuc-63	<u>QQYSSYPYT</u> FGGGTKLEIK
ADNc de VH humana	FGQGTKVEIK
VH de HuLuc-63	<u>QQYSSYPYT</u> FGQGTKVEIK

Diseño de regiones V de HuLuc63

La humanización de las regiones V del anticuerpo se llevó a cabo como se esboza en Queen, C. *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 10029-10033 (1989)). En primer lugar, se construyó un modelo molecular de las regiones variables de MuLuc63 con ayuda de los programas de ordenador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., *J. Mol. Biol.* 168: 595-620 (1983)). A continuación, sobre la base de una búsqueda de homología frente a secuencias de ADNc anticuerpos humanos, la secuencia E55 3-14 de VH (Cuisinier *et al.*, *Eur. J. Imm.* 23:110-118 (1993)) y el segmento de J JH1 (Ravetch, J.V. *et al.*, *Cell* 27: 583-591 (1981)) se seleccionaron para proporcionar los marcos para la región variable de cadena pesada HuLuc63. Para la región variable de la cadena ligera HuLuc63, se utilizó la secuencia III-2R de VL de ADNc (Manheimer-Lory *et al.*, *J. Exp. Med.* 174:1639-1652 (1991)). La identidad de los aminoácidos del marco entre VH de MuLuc63 y los marcos humanos receptores fue 81,6% (71/87), mientras que la identidad entre VL de MuLuc63 y los marcos humanos receptores fue 76,3% (61/80). Las alineaciones de MuLuc63, HuLuc63, y las secuencias receptoras humanas de aminoácidos para VH y VL se muestran en las Tablas 7 y 8, respectivamente. La Tabla 7 proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región VH. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH de MuLuc63 y HuLuc63 (SEC. ID. nº 45 y nº 47, respectivamente), y los segmentos humanos E55 3-14 y JH1 (SEC. ID. nº 46) se muestran en el código de una sola letra. Las secuencias de la CDR se basan en la definición de Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) están subrayadas en la secuencia de VH de MuLuc63; la numeración es también según Kabat. Las secuencias de las CDR en el segmento VH humano se omiten en la figura. Los únicos aminoácidos subrayados en la secuencia de VH de HuLuc63 se previeron para poner en contacto las secuencias de las CDR y, por tanto se sustituyeron con los restos de ratón correspondientes. La mutación de treonina (T) a alanina (A) realizada en CDR2 para eliminar el potencial sitio de glucosilación unido a N (NYT) se indica con un doble subrayado. La Tabla 8 proporciona una alineación de las secuencias de aminoácidos de la región VL. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VL de MuLuc63 y HuLuc63 (SEC. ID. nº 48 y nº 50, respectivamente), y la secuencia de III-2R humana de (SEC. ID. nº 49) se muestran en el código de una sola letra. Las secuencias de las CDR basadas en la definición de Kabat (*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)) están subrayados en la secuencia de VL de MuLuc63; la numeración también es según Kabat. Las secuencias de las CDR en el segmento VL humano se omiten en la figura. Los únicos aminoácidos subrayados en la secuencia de VL de HuLuc63 se previeron para poner en contacto las secuencias de las CDR y, por tanto se sustituyeron con el correspondiente resto de ratón.

Tabla 7: Alineación de las regiones con VH de MuLuc63 (SEC. ID. nº 45), E55 3-14 (SEC. ID. nº 46) y HuLuc63 (SEC. ID. nº 47)

	1	2	3	4
	0	0	0	0
MuLuc63	EVKLLES GGGLVQ PGGSLKLS CAASG FD FS RYWMSWVRQAPG			
E55 3-14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG FTFS-----WVRQAPG			
HuLuc63	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASG FD FS RYWMSWVRQAPG			
	5	6	7	8
	0 a	0	0	0 a
MuLuc-63	KGLEWIGEINPD S STINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMS			
E55 3-14	KGLEWVA-----RFTISRDNAKNSLYLQMN			
HuLuc-63	KGLEWIGEINPD S STINY A PSLKDKFIISRDNAKNSLYLQMN			
		1	1	
	9	0	1	
	bc 0	0ab	0	
MuLuc-63	KVRSEDTALYYCARPD G NYWYFDVWGAGTTVTVSS			
E55 3-14/JH1	SLRAEDTAVYYCAR-----WGQGT L TVTVSS			
HuLuc-63	SLRAEDTAVYYCARPDGNYWYFDVWGQGT L TVTVSS			

Tabla 8: Alineación de la región con VL de MuLuc63 (SEC. ID. n° 48), III-2R (SEC. ID. n° 49) y HuLuc63 (SEC. ID. n° 50)

	1	2	3	4
	0	0	0	0
MuLuc63	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGI AVAWY QKPGQ			
III-2R	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC-----WYQKPGK			
HuLuc63	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVGI AVAWY QKPGK			
	5	6	7	8
	0	0	0	0
MuLuc63	SPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA			
III-2R	VPKLLIY-----GVPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDVA			
HuLuc63	VPKLLIYWASTRHTGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQ PEDVA			
		1		
	9	0		
	0	0		
MuLuc63	DYFCQQYSSYPYTFGGG T KLEIK			
III-2R	TYYC-----FGQGT K VEIK			
HuLuc63	TYYCQQYSSYPYTFGQGT K VEIK			

En las posiciones de marco en las que el modelo informático sugería un contacto significativo con las CDR, los aminoácidos de las regiones V de MuLuc63 se sustituyeron por los aminoácidos del marco original humano. Esto se hizo en los restos 28, 48, 49, 66 y 68 de la cadena pesada (Tabla 7). Para la cadena ligera, la sustitución se hizo en el resto 60 (Tabla 8). Téngase en cuenta que el sistema de numeración utilizado en la presente memoria es el de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Además, la inspección de la secuencia de aminoácidos de MuLuc63 dió a conocer un sitio para la potencial glucosilación ligada a N en CDR2 de la región VH. Dichos sitios de glucosilación ligada a N tienen la secuencia general N-X-T/S (en la que N = asparagina, X = cualquier aminoácido, y S/T = serina o treonina). Dado que la presencia de la glucosilación ligada a N en el dominio variable podría tener efectos indeseables durante el desarrollo de HuLuc63 como anticuerpo terapéutico, el sitio de glucosilación potencial en CDR2 (NYT) se eliminó por sustitución de treonina con mutación de alanina (N-Y-A) en el diseño humanizado.

Construcción de genes de VH y VL de HuLuc63

Se diseñó un gen que codifica cada VH y VL de HuLuc63 como un minixón incluyendo un péptido señal, una señal de corte y empalme del donante, y sitios apropiados en enzimas de restricción para la clonación posterior en un vector de expresión de mamífero. Las señales de corte y empalme del donante en los minixones con VH y VL procedían de las secuencias JH6 y JK4, respectivamente, de la línea germinal humana correspondiente. Las secuencias de péptido señal en el VH y VL HuLuc63 minixones se deriva de la correspondiente MuLuc63

secuencias VH y VL, respectivamente. Las secuencias nucleotídicas de los genes VH y VL de Luc63, junto con secuencias de aminoácidos deducidas se muestran en las Tablas 5 y 6.

Los genes VH y VL de HuLuc63 se construyeron mediante la ampliación de oligonucleótidos sintéticos que se superponen que varían en longitud desde 33 hasta 43 bases y ampliación por RCP. (Stemmer *et al*, *Gene* 164:49-53 (1995)). Los fragmentos ampliados por RCP se purificaron mediante el kit de purificación de la RCP Qiaquick (Qiagen) y se digirieron con MluI y XbaI. El gen VH de HuLuc63 se subclonó en pHuHCg1.D para crear plásmido el pHuHCg1.D-HuLuc63. El gen VL de HuLuc63 se subclonó en pHuCkappa.rgpt.dE, derivado del vector de expresión pOKT3.Vk.rg de cadena ligera kappa (Cole, MS *et al*, *J. Immunol.* 159: 3613-3621 (1997)), para crear el plásmido pHuCkappa.rgpt.dE-HuLuc63.

Expresión de HuLuc63

El anticuerpo IgG1/k de HuLuc63 se producido por transfección temporal de células de cultivo tisular. La estirpe celular de riñón embrionario humano 293-H (Invitrogen, Carlsbad, CA) se mantuvo en DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contenía FBS al 10% (HyClone, Logan, UT) y aminoácidos no esenciales (Invitrogen). Se colocaron 1×10^6 células 293-H por pocillo en un volumen de 2,5 ml en una placa de 6 pocillos un día antes de la transfección utilizando medios regulares (DMEM + FBS al 10% + aminoácidos no esenciales). El día de la transfección, 4 µg de ADN plásmido por pocillo se diluyeron en 250 µl de hibridoma-SFM (H-SFM, Invitrogen). 10 µl de reactivo Lipofectamina 2000 (LF2000, Invitrogen) por pocillo se diluyeron en 250 µl de H-SFM. El ADN diluido se combinó con LF2000 diluida y se incubó durante 20 minutos para permitir que se formaran los complejos de ADN-LF2000. Se añadieron 500 µl de complejos de ADN-LF2000 a cada pocillo y se mezclaron inclinando la placa de un lado a otro. Las células se incubaron durante 5 días antes de recoger el sobrenadante para análisis.

La expresión de HuLuc63 se midió por ELISA intercalado. Placas Immulon 4 HBX (Thermo Labsystems, Franklin, MA) se recubrieron durante la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de 1,8 µg/ml de anticuerpos policlonales específicos de la cadena Fcγ anti-IgG humana en cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) en tampón carbonato-bicarbonato de sodio 0,2 M, pH 9,4, se lavaron con tampón de lavado (PBS que contenía Tween 20 al 0,1%), y se bloquearon durante 30 min a temperatura ambiente con 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo Superblock en TBS (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Después de lavar con tampón de lavado, las muestras que contienen HuLuc63 se diluyeron apropiadamente en tampón de ELISA (PBS que contenía ASB al 1% y Tween 20 al 0,1%) y se aplicaron 100 µl/pocillo a las placas de ELISA. Como patrón se utilizó anticuerpo monoclonal anti-CD33 humanizado IgG1/k HuM195 (Co, MS *et al*, *J. Immunol.*, 148: 1149-1154 (1992)). Después de incubar las placas durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, se detectaron los anticuerpos unidos utilizando 100 µl/pocillo de una dilución 1:1000 de anticuerpos policlonales de la cadena kappa anti-humanos en cabra conjugados con HRP (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Después de incubar durante 1 hora a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, se realizó el revelado de color mediante la adición de 100 µl/pocillo de sustrato ABTS (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). El revelado de color se detuvo mediante la adición de 100 µl/pocillo de 2% de ácido oxálico. Se leyó la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

Propiedades de unión de MuLuc63 y HuLuc63

Las afinidades de MuLuc63 y HuLuc63 a CS-1 humana se analizaron por ELISA de unión directa. Placas de ELISA de 96 pocillos (placas Immulon 4 HBX, Thermo Labsystems, Franklin, MA) se recubrieron con 100 µl de 1 µg/ml de proteína de fusión Fcγ3 humana con CS1 humana soluble en PBS durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar con tampón de lavado, los pocillos se bloquearon con 150 µl de tampón de bloqueo Superblock durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo HuLuc63 temporalmente expresado o el anticuerpo MuLuc63 purificado se diluyeron apropiadamente en tampón de ELISA y se aplicaron a placas ELISA (100 µl por pocillo). Las placas ELISA se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavaron los pocillos con tampón de lavado. A continuación, 100 µl de anticuerpos anti-Ck humanos en cabra conjugados con HRP o de anticuerpo anti-Ck de ratón en cabra conjugado con HRP (ambos de Southern Biotech) diluido 1:1000 en tampón de ELISA se añadió a cada pocillo de las placas con HuLuc63 y MuLuc63, respectivamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato ABTS (KPL). El revelado de color se interrumpió añadiendo 100 µl/pocillo de ácido oxálico al 2%. Se leyó la absorbancia a 415 nm utilizando un lector de microplacas VERSAmax. Los resultados de los experimentos de unión de ELISA mostraron que MuLuc63 y HuLuc63 se unen a CS-1-Fcγ3 humana en función de la concentración. El valor EC_{50} de HuLuc63, obtenido utilizando el programa informático GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), fue de 70,1 ng/ml. Este es similar al valor de EC_{50} de 66,1 ng/ml obtenido para MuLuc63, lo que indica que la humanización del anticuerpo MuLuc63 anti-CS1 monoclonal de ratón se logró: HuLuc63 conservó gran afinidad de unión a CS1 humana.

Ejemplo 6: Función de CS1 en los trastornos autoinmunitarios

CS1 se sobreexpresa en linfocitos T y B estimulados, en comparación con las células no estimuladas:

Para determinar la expresión de CS1, se montó un ensayo *in vitro* para estimular los linfocitos B y T la sangre periférica, utilizando mitógeno de hierba carmín (PWM) y los estimulantes de fitohemaglutinina (PHA). Las células mononucleares de la sangre periférica de referencia no estimuladas se prepararon en paralelo sin estimulación. Se aisló PolyA⁺ ARNm y se sintetizó ADNc a partir de estas muestras utilizando técnicas estándar. El gen de CS1 se amplió por RCP utilizando cebadores oligonucleotídicos específicos para CS1 (véase más arriba) y la expresión se cuantificó utilizando Biorad Gel Doc 2000. Se normalizaron las intensidades de la señal para controlar β -actina humana. El análisis de RCP en tiempo real indicaba que CS1 mostraba aproximadamente un aumento de 23 veces en los linfocitos B activados de la sangre periférica y aproximadamente un aumento de 30 veces en los linfocitos T activados de la sangre periférica, en comparación con las células no estimuladas.

CS1 aumenta en los linfocitos B de la sangre periférica de pacientes de lupus, en comparación con los de los adultos sanos de la misma edad:

Para evaluar la expresión de CS1 en pacientes con lupus en comparación con individuos sanos, se aislaron linfocitos B de sangre periférica por clasificación celular de las células CD19⁺ de un paciente con lupus en comparación con las de un grupo de adultos sanos. Se aisló PolyA⁺ ARNm y se sintetizó ADNc utilizando técnicas habituales. La expresión de CS1 se evaluó por RCP en tiempo real utilizando cebadores de oligonucleótidos específicos para CS1. Los datos de RCP en tiempo real indicaron que CS1 aumenta aproximadamente 2 veces en linfocitos B del paciente con lupus, en comparación con los individuos sanos. Tras la normalización con β -actina, el gen de CS1 aumentó 2,3 veces en ADNc de linfocitos B de pacientes con lupus en comparación con el ADNc de los individuos sanos. Cuando se normalizaba con cebadores de 18S ARNr, CS1 aumentó 1,8 veces en las muestras de ADNc respectivas.

Aumento nuevo LY9 de ratón en las linfocitos B y T activados:

El nuevo LY9 de ratón es un ortólogo propuesto de CS1 humana (Tovar *et al.*, *Immunogenetics* 54: 394-402 (2002)). La expresión del nuevo LY9 de ratón en linfocitos B activados y linfocitos T activados se examinó con RCP en tiempo real. Los datos demostraron que el nuevo LY9 de ratón aumenta en linfocitos B activados y linfocitos T activados.

La expresión del nuevo LY9 ratón se analizó con un sistema de detección de secuencias ABI GeneAmp 5700 (véase el Ejemplo 2). Tras la normalización con cebadores de 18S ARNr, el gen LY9 aumentó 3 veces en el ADNc estimulado por ConA, y aumentó 6 veces en el ADNc estimulada por LPS en comparación con el ADNc esplénico no estimulado.

Aumento de CS1 en el tejido de la enfermedad inflamatoria intestinal

La expresión de la(s) proteína(s) moduladora(s) EII en el tejido EII (tanto la enfermedad de Crohn como la colitis ulcerosa) en comparación con el tejido normal se determinó en matrices de microchip, como se describió anteriormente. Los chips de oligonucleótidos se interrogaron con ARNc procedentes de múltiples tejidos. Más específicamente, se generaron ARNc en ensayos de transcripción *in vitro* (TIV) de nueve EII y nueve muestras emparejadas adyacentes normales del intestino, y 24 muestras de epitelio de colon. La hibridación de ARNc a los chips de oligonucleótidos se midió mediante la intensidad media de fluorescencia (AI), que es directamente proporcional al nivel de expresión del gen.

Se analizaron los datos comparando los niveles de expresión génica en EII con tejidos y órganos de adulto no patógenos. Uno de los genes identificados con un aumento significativo en la expresión génica en el tejido de la enfermedad inflamatoria intestinal en comparación con el tejido normal es CS1. Un análisis de chip demostró que la expresión del gen CS1 aumenta en la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn en comparación con células epiteliales de colon de adultos sanos.

Para evaluar más la expresión de CS1 en inflamatorias pacientes con la enfermedad intestinal inflamatoria en comparación con individuos sanos, muestras de secciones enfermas del intestino grueso de 2 pacientes con enfermedad de Crohn y 3 pacientes con colitis ulcerosa frente a muestras normales de intestino grueso de 3 adultos sanos se disgregaron, se lavaron y se colocaron en TRIZOL[®]. Se aisló ARN completo siguiendo el protocolo del fabricante. Se trató ARN completo con ribonucleasa sin desoxirribonucleasa (GenHunter). El ARN digerido con desoxirribonucleasa se extrajo con fenol/cloroformo, y se precipitó con etanol durante la noche. ARN se lavó con etanol al 75% y se disolvió en agua sin nucleasa. Se cuantificó el ARN y se analizó la totalidad del ARN en un gel de agarosa. Los datos de RCP en tiempo real indicaron que CS1 aumenta 7 veces y 6 veces en el intestino grueso enfermo de pacientes con enfermedad de Crohn (n = 2) y 13 veces, 14 veces y 46 veces en intestino grueso enfermo de pacientes con colitis ulcerosa (n = 3) en comparación con el intestino normal combinado de individuos sanos (n = 3).

Ejemplo 7: Expresión de CS1 en células cancerosas

Modelo de expresión de la proteína CS1:

La expresión de la proteína CS1 se siguió examinando con los anticuerpos Luc producidos por análisis FACS. Las estirpes celulares se incubaron con anticuerpos anti-CS1 Luc90.H1 o anticuerpos de control de isotipo IgG2b de ratón durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con PBS y se añadió anti-Ig de ratón conjugada con ficoeritrina (PE) a las células y se incubaron durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y analizaron por citometría de flujo en un FACS Caliber (Becton Dickinson). Estos datos demuestran que CS1 se expresa en la estirpe de células ARH-77 de leucemia, en las estirpes de células linfoblastoides B CESS e IM9 y en las estirpes celulares de mieloma L363, LP1 y OPM2.

Las muestras de pacientes con mieloma múltiple (n = 21 muestras de médula ósea), de un paciente con GMSI (gammapatía monoclonal de significado incierto, n = 1), de un paciente con leucemia de células plasmáticas (n = 1), de células madre CD34⁺ movilizadas de la médula ósea (n = 5), de células de médula normales (n = 3), de tejido normal de ganglios linfáticos (n = 1), de pacientes con leucemia linfoblástica crónica (LLC, n = 15), de pacientes con leucemia mielógena aguda (AML, n = 11), de un paciente con linfoma no hodgkiniano (NHL, n = 1) y de un paciente con linfoma de Hodgkin (n = 1) se incubaron con anticuerpos conjugados con FITC contra CS1 (Luc90 o Luc63), CD45-PerCP, CD38-PE y/o CD138-PE y se procesaron como se ha detallado anteriormente para el análisis de FACS de células de mieloma. Los anticuerpos anti-CS1 de ratón utilizados en este documento son Luc90 (IgG2b), Luc63 (IgG2a), Luc38 (IgG2b) y otros anticuerpos anti-CS1 Luc producidos. Los anticuerpos de control de isotipo eran anticuerpos de IgG de ratón del mismo isotipo.

Se extrajeron aspirados de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple de la Clínica Cleveland. Las estirpes celulares de mieloma (LP1, L363, OPM2, NCI-H929, RPMI 8226 y U266 B1), la estirpe celular de leucemia ARH-77, las estirpes linfoblastoides B (IM9, CESS) y células de la médula ósea se tiñeron con anticuerpos anti-CS1 monoclonales frente a anticuerpos de control de isotipo (Becton Dickinson) siguiendo un protocolo de tinción estándar. Se lavaron las células, se colocaron en tampón de tinción (RPMI, FBS al 10% para células humanas o DMEM, FBS al 10%), y anticuerpos anti-CS1 frente a anticuerpos de control de isotipo se añadieron a 0,5-1 µg de anticuerpos por millón de células en un volumen final de 0,1 ml. Para las muestras de pacientes, se lisaron los glóbulos rojos, y las células se sedimentaron en una centrífuga y se volvieron a poner en suspensión en tampón de tinción. Para los anticuerpos que no estaban directamente conjugados con FITC, se añadieron anticuerpos de la segunda etapa a anticuerpo 0,5-1 µg por millón de células en 0,1 ml de volumen final. Se lavaron las células y se volvieron a poner en suspensión en tampón de tinción para el análisis FACS en un FACSCaliber de Becton Dickinson utilizando el programa informático CellQuest. Para distinguir las células plasmáticas, se tiñeron células de médula ósea con mieloma múltiple con anticuerpos monoclonales anti-CD45, anti-sindecano-1 (CD138) y anti-CD38. Anti-sindecano-1 (CD138) tiñe específicamente las células plasmáticas y no otros leucocitos.

Los resultados demuestran que CS1 se sobreexpresa en células plasmáticas (por ejemplo, células CD138⁺) de diez pacientes con mieloma múltiple y células de plasma de un paciente leucemia de células plasmáticas, así como en varias estirpes celulares de mieloma (L363, LP1 y OPM2). Un total de 21 muestras diferentes de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple se han ensayado por flujo y para 21 de cada 21 muestras, virtualmente todas las células plasmáticas de la médula ósea expresan a CS1. CS1 se expresa también en células ARH-77 de leucemia y en estirpes celulares linfoblastoides B (IM9 y CESS).

Ejemplo 8 - Expresión de CS1 en células de plasma de paciente con mieloma

Muestras de médula ósea de un paciente con mieloma múltiple se tiñeron con CD138-PE, CD45PerCP, Luc90-FITC, y/o IgG2b-FITC (anticuerpo de control de isotipo) y se analizaron por FACS como se ha detallado anteriormente (véase el Ejemplo 5). Se controlaron las células que contienen linfocitos, monocitos, granulocitos, eritrocitos, células plasmáticas y los blastocitos. Los datos demostraron que CS1 se expresa en células plasmáticas (por ejemplo, células CD138⁺) de paciente con mieloma múltiple.

Ejemplo 9: Anticuerpo anti-CS1 Monoclonal disminuye la secreción de IgM por linfocitos B activados de sangre periférica

Se aislaron células mononucleares de la sangre periférica de un adulto normal por un gradiente de Ficoll normal, se incubaron con mitógeno de hierba carmín a 10 µg/ml (GIBCO/BRL, Inglaterra, Reino Unido), y se sembraron en una placa de 24 pocillos en un volumen total de 1 ml. Anticuerpo monoclonal (anti-CS1 humano de ratón (Luc63) o control de isotipo IgG de ratón) se añadió a pocillos de muestra a 100 µg/ml o 10 µg/ml. Las células y el anticuerpo se incubaron a 37°C en CO₂ al 7% durante 8 días. Se aislaron los sobrenadantes de los cultivos y se ensayó IgM por ELISA como se describió anteriormente. El resultado demostró que el anticuerpo Luc63 a 100 µg/ml o 10 µg/ml disminuía la secreción de IgM de las células mononucleares de la sangre periférica en comparación con la secreción de IgM por las células incubadas con el control de isotipo a 100 µg/ml o 10 µg/ml o sin anticuerpo.

Anticuerpo anti-CS1 monoclonal disminuye la secreción de IgM por los linfocitos B activados de la sangre periférica de pacientes con enfermedad autoinmunitaria:

Los sobrenadantes de los cultivos celulares de células mononucleares de sangre periférica se aislaron como se ha

detallado anteriormente y se ensayaron por ELISA. Se recubrieron placas de Immulon-1 con 100 µl de 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IgM humana de ratón (catálogo nº 05-4900, Zymed Laboratories, Inc., Sur de San Francisco, California) en PBS. Las placas se bloquearon durante 1 hora con tampón de ELISA ("EB" = PBS + ASB al 0,1% + Tween 20 al 0,05%). Los sobrenadantes de cultivo se añadieron a diversas diluciones (en EB) a 100 µl/pocillo. Los sobrenadantes y IgM humana estándar (catálogo nº 009-000-012, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) se incubaron durante 1 a 2 horas a temperatura ambiente. La IgM humana capturada se reveló con anticuerpo policlonal anti-IgM humana-HRP en cabra (catálogo nº 2020-05, Southern Biotech Association, Birmingham, Alabama) y sustrato de HRP, siguiendo el protocolo del fabricante. La IgM unida se visualizó por espectrofotometría (405 nm D.O.) en un lector de placas ELISA normal. Los datos demostraron que la cantidad de la IgM segregada de las CMSP de pacientes con lupus se redujo de 0,18 µg/ml cuando se trataron con un anticuerpo controlado por isotipo a 0,10 µg/ml por el tratamiento con anticuerpos anti-CS1 de anticuerpos (Luc90H1). Un anticuerpo anti-CD2 de control positivo que segregó IgM a 0,12 µg/ml demostró que el anticuerpo anti-CS1 es aún más sólido en la reducción de la producción de IgM que el anticuerpo anti-CD2.

El anticuerpo monoclonal anti-CS1 disminuye la producción de IgG por linfocitos B de la sangre periférica de adultos sanos y de pacientes con enfermedad autoinmunitaria.

La producción de IgG por linfocitos B de la sangre periférica de adultos sanos y pacientes con enfermedades autoinmunitarias (lupus) se analizaron al igual que la producción de IgM. El resultado demostró que la producción total por las células mononucleares de la sangre periférica de adultos sanos 9 días después del tratamiento con el anticuerpo anti-CS1 (Luc90H.1) disminuyó en aproximadamente un 23% en comparación con el control de isotipo IgG2b. La producción total de IgG por las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus 9 días después del tratamiento con anti-CS1 anticuerpo (Luc90H.1) disminuyó en aproximadamente un 56% en comparación con el control de isotipo IgG2b. Las Tablas 3A y B resumen la inhibición de la producción de IgG por numerosos anticuerpos anti-CS1 generados. Como se muestra en la Tabla 3A, Luc90.H1 reduce en aproximadamente 40% la producción de IgG por las CMSP activadas con lipopolisacárido o mitógeno de hierba carmín. Luc34.1 redujo en un 38% la producción de IgG por las CMSP activadas con mitógeno de hierba carmín. Como se muestra en la Tabla 3B, Luc 90.H1 redujo la producción de IgG de las CMSP de un adulto sano y de una estirpe de linfocitos B maduros (células IM9) en aproximadamente un 48%. Luc 34.1 redujo la producción de IgG de las CMSP de un adulto sano alrededor de un 53%. Luc 63.2 redujo la producción de IgG de las CMSP y las células IM9 en aproximadamente 47%. A partir de estos experimentos, es evidente que Luc 90H.1, Luc34.1, y Luc 63.2 son los mejores anticuerpos funcionales. A partir de la cartografía de epítomos, Luc90 y Luc63 presentan epítomos no superponibles.

Tabla 3A. Anti-CS-1 disminuye la producción de Ig por linfocitos B activados *in vitro*

Descenso medio porcentual comparado con control de isotipo

CMSP activadas <i>in vitro</i>	Anti-CS-1 MAB	Disminución media % HuIgG ± SE
Lipopolisacárido	Luc 90.H1	41% ± 8% (n = 3)
Mitógeno de hierba carmín	Luc 90.H1	39% ± 9% (n = 4)
Mitógeno de hierba carmín	Luc 34.1	38% ± 7% (n = 4)

Tabla 3B. Resumen de las pruebas de producción de Ig con panel de anticuerpos anti-CS-1

CAMBIO MEDIO POR CIENTO EN Ig COMPARADA CON CONTROL DE ISOTIPO

Anti-CS1 Mab	PMBC 55 donantes	PMBC 705 donantes	IM9	Cambio promedio % en Ig
Luc90H.1	-44%	-56%	-43%	-48%
Luc37	+11%	-43%	-11%	-14%
Luc23	-13%	-4	+6%	-4%
Luc63.2	-55%	-51%	-36%	-47%
Luc34.1	-64%	-49%	-45%	-53%
Luc38.1	-22%	-44%	-21%	-29%
Luc29D6	-43%	-44%	-25%	-37%

Disminución relativa en la producción de Ig

Grupo A (>45% dism.): Luc 90, 63, 34
 Grupo B (29-37% dism.): Luc 38, 29D6
 Grupo C (4-14% dism.): Luc 37, 23

Los resultados experimentales indicaron que los anticuerpos anti-CS1 disminuyen la producción tanto de IgG como de IgM por linfocitos B en la sangre periférica *in vitro*.

Ejemplo 10: Reducción *in vivo* de la IgG por anticuerpos monoclonales CS1 en un modelo de ratón SCID-HuCMSP.*Modelo de ratón SCID-HuCMSP*

Células mononucleares de la sangre periférica humanas (CMSP) se aislaron por gradientes de densidad Ficoll-paque estándar (Amersham Biosciences) y se volvieron a poner en suspensión en solución tamponada con fosfato (PBS) en 2 veces 10^7 CMSP/ml. Las CMSP de nuevo en suspensión (1 ml) se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) en ratones C.B-17 SCID. Dos a tres semanas después de la inyección de CMSP, se extrajeron muestras de suero de los ratones y se analizó IgG humana por ELISA. Ratones injertados (que producen >1 µg/ml de IgG humana en el suero) se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento y después se trataron con anticuerpos monoclonales anti-CS-1 humanos en ratón (Luc90.H1 o Luc63.2.22), anticuerpos de control de isotipo de ratón (IgG2b o IgG2a, respectivamente) o PBS. Se administraron a los ratones dosis con 200 µg de anticuerpo en 500 µl de PBS cada 3 a 4 días con 3 ó 4 dosis de anticuerpo. En el suero de los ratones se analizó la IgG humana por ELISA utilizando protocolos estándar.

Se calculó el porcentaje de cambio en la IgG humana del suero en cada ratón restando la concentración de IgG humana antes de la primera dosis de anticuerpo (día 0) de la concentración de IgG humana después de la dosis (día x), dividiendo por la concentración de IgG humana antes de la primera dosis (día 0) y multiplicando por 100, por ejemplo, $[(\text{día } x - \text{día } 0)/\text{día } 0] \times 100$. Los datos se muestran como el cambio porcentual media con la desviación estándar para cada grupo de ratones. Las concentraciones de IgG humanos son la concentración promedio con la desviación estándar para cada grupo de ratones. La prueba de la t de la muestra 2 de Welch se utilizó para comparar el porcentaje de cambio en la IgG humana a través de los grupos de tratamiento.

*Anticuerpos anti-CS1 redujeron la producción de IgG humana *in vivo**

Los datos demuestran que los anticuerpos anti-CS1 de la presente invención reducen la producción de inmunoglobulina humana sustancialmente en el modelo de transferencia de SCID-HuCMSP. Como se muestra en la figura 1A, Luc90.H1 mantuvo el aumento en la producción de IgG en PBS y el control de isotipo ya el 4º día (4 días después del tratamiento con la primera dosis del anticuerpo). Esta reducción continuó a lo largo de las 7 semanas (día 32º) del período de prueba. Por ejemplo, el día 18º, la producción de IgG humana aumentó en un 225% en el control de isotipo IgG2b, en un 181% en el control de PBS, mientras que la producción de IgG humana disminuyó un 14% con tratamiento con Luc90H.1. Luc90H.1 no sólo suprimió el aumento de 181-225% en la producción de IgG humana en los grupos de referencia, sino también dio lugar a una disminución adicional de 14% en la producción de IgG. El día 25º, Luc90H.1 no sólo suprimió el aumento al triple en la producción de IgG humana en los grupos de referencia, sino que también proporcionó una disminución adicional de 24% en la producción de IgG humana.

Luc 63.2 también redujo eficazmente la producción de IgG *in vivo*. Como se muestra en la figura 1B, Luc63.2 suprimió del 37 al 46% de aumento en la producción de IgG humana en los grupos de referencia (PBS y control de isotipo IgG2a) y dio lugar a una disminución adicional de 59% en la producción de IgG. En este mismo estudio, Luc90.H1 se comparó con Luc63.2 y Luc90.H1 suprimió el incremento de 37-114% en los grupos de referencia (PBS y control de isotipo IgG2b) y proporcionó una disminución adicional de 14% en la producción de IgG por los ratones injertados con células mononucleares humanas de la sangre periférica (CMSP).

La figura 1C además resume la reducción de la producción de Ig por tratamiento con Luc90 y Luc63 en el modelo SCIDHuCMSP. Si bien suprimiendo el aumento de la producción de IgG en los ratones tratados con controles de isotipo y de PBS, Luc90 produjo una disminución adicional en la producción de IgG de un 14%, 22%, 24% y 39%, y Luc63 tuvo una disminución adicional del 40% y 59%. Por lo tanto, se puede concluir que el tratamiento con anti-Luc de ratones SCID injertados con CMSP humanas (SCID-HuCMSP) no sólo suprime completamente el aumento de la inmunoglobulina humana observado normalmente en el suero de estos animales, sino que también da una disminución adicional en comparación con los niveles de pretratamiento.

Ejemplo 11: Actividades de CCDA de anticuerpos anti-CS1*Preparación de células efectoras:*

Células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) (células efectoras) se aislaron de la sangre completa utilizando gradientes de densidad estándar Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences). Las células se lavaron y se volvieron a poner en suspensión en medio RPMI enriquecido con 1% de albúmina de suero bovino (ASB).

Preparación de células diana:

Las células transfectantes estables que expresa CS-1 de superficie celular (células diana) se lavaron y se volvieron a poner en suspensión en medio RPMI enriquecido con 1% de ASB. Las células se sembraron en placas a razón de 100.000 células/pocillo en un volumen total de 50 µl. Anticuerpos monoclonales anti-CS-1 humanos de ratón (Luc90.H1 o Luc63.2.22) o anticuerpos de control de isotipo (IgG2b de ratón o IgG2a, respectivamente) se añadieron

en varias concentraciones a las células diana en un volumen final de 100 µl, y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Después de la incubación, 100 µl de CMSP efectoras se añadieron a las células diana en una proporción de 20:1 en 200 µl de volumen final. Las células diana y efectoras se incubaron a 37°C durante 5 horas o durante la noche. Las células se centrifugaron a 350 x g durante 5 minutos, y se recogieron 100 µl/pocillo de sobrenadante y se transfirieron a una placa de microvaloración de fondo plano ópticamente transparente de 96 pocillos.

Ensayo con lactato deshidrogenasa:

Para determinar la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) contenida en los sobrenadantes, se añadieron a cada pocillo 100 µl de mezcla de reacción del Kit para detección de citotoxicidad (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), y las muestras se incubaron durante 30 minutos entre 15 y 25°C. Durante este periodo de incubación, la placa de microvaloración se protegió de la luz. La absorbancia de las muestras se midió a 490 nm utilizando un lector de ELISA.

Para determinar el porcentaje de citotoxicidad en la que intervienen células, se calculó la absorbancia media de las muestras y referencias de fondo se restaron utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Citotoxicidad (\%)} = \frac{\text{liberación de LDH}_{\text{muestra}} - \text{SR}_{\text{efector}} - \text{SR}_{\text{diana}}}{\text{MR}_{\text{diana}} - \text{SR}_{\text{diana}}} \times 100$$

SR: Liberación espontánea

MR: Liberación máxima

Los controles experimentales fueron la liberación espontánea de las células diana solas o de las células efectoras solas. Las células diana se ensayaron en solución al 2% de Triton X-100 (1:1).

Los anticuerpos anti-CS1 provocan citotoxicidad procedente de anticuerpos (CCDA)

El experimento demostró que los anticuerpos anti-CS1 Luc63.2 y Luc90 produjeron citotoxicidad (CCDA) procedente de anticuerpos de las células que expresan CS1 en presencia de CMSP (células efectoras). Los resultados demostraron que Luc90 provoca citotoxicidad en función de la dosis. Una cantidad de 50 µg/ml de Luc90 provocó casi el 50% de citotoxicidad de las células diana. Luc63.2 generalmente provocaba del 60 al 80% de citotoxicidad de las células diana con un intervalo de dosis de 10 a 50 µg/ml. Se obtuvieron resultados similares en los experimentos realizados con dos donantes más.

Ejemplo 12: Actividad de CCDA anticuerpos CS1 con poca fucosa

Clonación de los ADNc de la región variable de Luc90

Las regiones variables murinas (secuencias ID nº 3 y nº 4) se clonaron en la estirpe celular de hibridoma Luc90 por procedimientos estándar. En resumen, se extrajo ARN completo y se sintetizó ADNc bicatenario utilizando el kit de ampliación de ADNc SMART 5'-RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del proveedor. Para la determinación de la secuencia se clonaron fragmentos de RCP de los ADNc de la región variable en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA). Se secuenciaron varios clones de plásmidos por cada una de las cadenas pesada y ligera. Se identificaron secuencias exclusivas homólogas a las regiones variables de cadena pesada y ligera de los ratones.

Construcción de vectores de expresión VH y VL de Luc90 híbridos

Se diseñó un gen que codifica cada VH y VL de Luc90 como un miniexón incluyendo un péptido señal, una señal donante de corte y empalme, la secuencia de iniciación de Kozak y secuencias de enzimas de restricción apropiados para la clonación posterior en un vector de expresión de mamífero. Los cebadores se diseñaron para que contengan las secuencias de restricción apropiados y la complementariedad de RCP a partir de los vectores TOPO que contienen los genes VH o VL. Los fragmentos ampliados por RCP se purificaron con el kit Qiaquick para purificación por RCP (Qiagen) y se digirieron con MluI y XbaI. El gen VH de Luc90 se subclonó en pHuHCg1.D (natural) o pHuHCg1.D.AA (mutante de BS) para crear los plásmidos pChiHuHCg1.D-MuLuc90VH y pChiHuHCg1.D.AA-MuLuc90VH, respectivamente. El mutante de BS contiene dos cambios de aminoácidos (L234A/L235A) en la región CH2 de IgG1, de modo que se suprime la unión a los receptores Fc (Xu *et al.*, (2000) *Cell Immunol.* 200:16-26). El gen VL de Luc90 se subclonó en pVk para crear el plásmido pChiVk-MuLuc90VL. Se crearon vectores de expresión de plásmido aislados de tal manera que los genes de la cadena pesada y ligera se pueden expresar a partir de un único plásmido. Los vectores de cadena pesada se digirieron con EcoRI para eliminar toda la región de la cadena pesada y se subclonaron en una única vista de EcoRI en el vector de cadena ligera. La cadena pesada del mutante de BS se combinó con el fragmento del vector pChiVk-MuLuc90VL para crear el plásmido pChiLuc90-BSK, mientras que la cadena pesada natural se subclonó en el vector pChiVk-MuLuc90VL para crear el plásmido pChiLuc90-g1K.

Expresión de Luc90 híbrido

Se produjeron anticuerpos híbridos Luc90 IgG1/k natural y BS por transfección estable de células Sp2/0 con los vectores pChiLuc90-g1K y pChiLuc90-BSK, respectivamente. Un anticuerpo con poca fucosa se produjo por transfección estable de células YB2/0 con el vector pChiLuc90-g1K. Se seleccionaron clones positivos con medio ácido micofenólico y se identificaron por ELISA. El clon natural AH4, el mutante de BS HG12 y el clon 5E4 con poca fucosa se seleccionaron para sobreexpresión, se adaptaron a medio exento de suero de hibridoma de Gibco con 2% de suero bovino fetal con poca Ig. Se cultivaron cultivos de dos litros en botellas sobre rodillos para purificación. Los anticuerpos se purificaron por cromatografía en columna de afinidad con proteína-G convencional.

Los resultados demostraron que los anticuerpos anti-CS1 híbridos de Luc90 estimulan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células que expresan CS1 en una estirpe celular estable que expresa CS1 humana y dos estirpes celulares de mieloma humano, OPM2 y L363. En cada caso, la citotoxicidad aumenta significativamente por los anticuerpos que tienen bajos niveles de fucosa (por crecimiento en células YB2/0, como se detalló anteriormente).

Ejemplo 13: Tratamiento del mieloma con anticuerpos anti-CS1

El tratamiento con anticuerpo anti-CS1 *in vivo* se realizó en un modelo de tumor de mieloma de ratón inyectando anticuerpos por vía intraperitoneal en el paciente de la prueba. Como se muestra en la figura 2, tratamiento con anticuerpos anti-CS1 (Luc63 y Luc90) disminuye el tamaño del tumor en comparación con animales tratados con control de isotipo. En este estudio, se inyectaron por vía ip 1×10^7 células de mieloma (estirpe celular de mieloma L363) en ratones CB.17 SCID. Dos semanas después, cuando el tamaño del tumor alcanzó $\sim 80 \text{ mm}^3$, los ratones se agruparon al azar en 4 grupos con 8 ratones por grupo. Los ratones se trataron con anticuerpos anti-CS1 (Luc63 o Luc90) o anticuerpos de control de isotipo (IgG2a de ratón o IgG2b de ratón). Se administraron a los ratones dosis con 200 μg de anticuerpo/ratón para 8 dosis a 3 dosis por semana. Los resultados demuestran que los ratones tratados con anticuerpos anti-CS1 han reducido significativamente los volúmenes tumorales en comparación con los ratones con anticuerpos de control de isotipo. El día 25° del estudio (después de 5 dosis), los ratones tratados con Luc 63 muestran el tamaño del tumor promedio de $\sim 100 \text{ mm}^3$ en comparación con ratones tratados con de control de isotipo IgG2a (tamaño medio del tumor $\sim 800 \text{ mm}^3$). Los ratones tratados con Luc 90 presentan un tamaño medio del tumor de $\sim 400 \text{ mm}^3$ en comparación con ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo IgG2b (que tienen un tamaño medio del tumor de $\sim 950 \text{ mm}^3$). Los ratones tratados con anti-CS1 Luc63 no tienen tumores que pueden medirse hasta 2,5 semanas después del tratamiento, señalando la eficacia sorprendente de los anticuerpos en la eliminación de células cancerígenas.

Otros sistemas modelo para mieloma incluyen ratones SCID implantados por vía intravenosa (iv), intraperitoneal (ip) o inyectados directamente en los huesos (ortotópicamente) con mieloma te marcado por fluorescencia o sin marcar o estirpes de células B maduras, por ejemplo, ARH77, CESS, IM9, L363, LP1 y OPM2. Estas estirpes se utilizarán para probar los efectos del tratamiento con antagonistas en sistemas de modelos animales de mieloma. Estas estirpes celulares expresan el antígeno reconocido por anticuerpos anti-CS1 humana. Los animales se distribuyen al azar en grupos y se sometieron a un régimen de tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo). Los anticuerpos se administran a varios niveles de dosificación, por ejemplo una dosis de 1 a 10 mg/kg para un total de 9 a 10 dosis administradas por vía intraperitoneal cada 3 a 4 días. El tamaño del tumor se mide dos veces a la semana durante 35 a 40 días por cada grupo de tratamiento. Se observan manifestaciones clínicas de mieloma. Se registran las fechas de muerte de cada ratón.

Se iniciarán estudios en animales también para determinar la posible sinergia entre el tratamiento con anticuerpos anti-CS1 y quimioterapia. Se dejaron crecer tumores de xenoinjertos hasta que alcanzaron un tamaño aproximado entre 50 y 100 mm^3 , y para los ratones inyectados por vía iv, ip u ortotópicamente, las células cancerosas pueden injertarse en animales. En ese momento, los animales se distribuyeron al azar en grupos y se sometieron a un régimen de tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo). Alternativamente, los animales pueden someterse a tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo) en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar, incluyendo combinaciones de prednisona y melfalán o de otros agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida o clorambucilo) o vincristina, doxorubicina y tratamiento con dexametasona en dosis altas (VAD) u otros regímenes de quimioterapia conocidos por los expertos en la técnica. Los anticuerpos se administran a varios niveles de dosis, por ejemplo una dosis de 1 a 10 mg/kg para un total de 9 a 10 dosis administradas por vía intraperitoneal cada 3 a 4 días. La quimioterapia se administra por vía intraperitoneal cada 3 a 4 días a una concentración eficaz, por ejemplo 1 mg/kg u otra dosis eficaz que es conocida por los expertos en la técnica. El tamaño del tumor (para animales inyectados por vía sc) se mide dos veces a la semana durante 35 a 40 días para cada grupo de tratamiento. Se observan manifestaciones clínicas del mieloma, incluyendo inmunoglobulina del suero en ratones inyectados con estirpes celulares que segregan inmunoglobulina humana (IM9, CESS, ARH-77, y LP-1). Se registran las fechas de la muerte de cada ratón. Se evaluará la eficacia del tratamiento con anticuerpos con y sin quimioterapia.

Ejemplo 14: Tratamiento del mieloma múltiple con anticuerpos anti-CS1 humanizados

El tratamiento con un anticuerpo anti-CS1 humanizado *in vivo* se realizó en un modelo de tumor en ratón con mieloma múltiple inyectando por vía intraperitoneal anticuerpos en el sujeto de la prueba, similar al ejemplo descrito en el Ejemplo 13. A ratones hembra ICR/SCID se les implantó por vía subcutánea (costado) la estirpe de mieloma múltiple OPM-2 (10 millones de células/animal). Los tumores se dejó que se consolidaran los tumores y una vez que los tumores habían alcanzado un promedio de 100 mm³ los ratones se distribuyeron al azar en 8 grupos (8 grupos de 8 ratones cada uno, volumen tumoral promedio 100 mm³).

Los ratones se trataron a continuación con los siguientes anticuerpos, dosificados por vía intraperitoneal 3 veces a la semana.

Grupo1 Control de solución salina tamponada con fosfato (PBS)

Grupo 2 Anticuerpo Luc63 murino a 10mg/kg (MULuc63)

Grupo 3 Anticuerpo IgG1 humanizado inaplicable como referencia a 10 mg/kg (cHUIgG1)

Grupo 4 Luc63 humanizado a 10 mg/kg (HULuc63)

Grupo 5 Luc63 humanizado en 3 mg/kg (HULuc63)

Grupo 6 Luc63 humanizado con mutaciones de alanina en los restos 234 y 235 a 10 mg/kg (HuLuc63a,a) - esta mutación se sabe que afecta a la unión de la IgG1Fc a los FcR y por lo tanto los impacta con la capacidad de los anticuerpos para impartir funciones dependientes de Fc incluyendo la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).

El resultado de este experimento se muestra en la figura 3. Como se observó anteriormente el anticuerpo MULuc63 a 10 mg/kg fue eficaz para reducir el crecimiento del tumor *in vivo*. El día 46° (5 días después de la última de las 9 dosis de anticuerpos) 5 de cada 8 animales no tenían tumores mensurables. Aunque el HULuc63 fue eficaz tanto a 3 mg/kg como a 10 mg/kg para reducir el crecimiento del tumor el anticuerpo humanizado no funciona tan eficientemente en ratones como el anticuerpo murino. Es interesante que el anticuerpo Luc63 humanizado que se había mutado en los restos 234 y 235 no pudo demostrar eficacia alguna en este modelo. En efecto, al igual que los dos grupos de referencia, PBS e IgG1 humanizada (cHUIgG1), los animales tratados con el mutante HULuc63a,a tuvieron que ser sacrificados el día 39° (el día de la 8ª dosis de anticuerpos) debido a que los tumores se habían vuelto demasiado grandes (y según las normativas del IACUC los animales debían ser sacrificados). Los datos generados con el mutante HULuc63a,a indican que el fragmento Fc del anticuerpo es importante en este modelo y sugieren que uno de los mecanismos por los que el anticuerpo Luc63 (y sus versiones humanizadas) actúan es a través de una función efectora en el que interviene Fc tal como CCDA (o, posiblemente, la reticulación de receptores).

Los resultados sugieren que la eficacia de un anticuerpo CS1 en la terapia humana puede aumentarse incrementando la actividad de CCDA del anticuerpo. Los procedimientos para aumentar la actividad de CCDA incluyen proporcionar un anticuerpo con poca fucosa del Ejemplo 12 y generar mutación en la fracción Fc de un anticuerpo CS1, particularmente las mutaciones que aumentan la afinidad del anticuerpo por un receptor de FcγR como el proporcionado en la patente US nº 6.737.056B1 y en la solicitud de patente US 2004/0132101A1.

Los pacientes también pueden someterse a tratamiento con anti-anticuerpos CS1 humana en combinación con agentes quimioterápicos normales, incluyendo combinaciones de prednisona y melfalán o de otros agentes alquilantes (por ejemplo, ciclofosfamida o clorambucilo) o vincristina, doxorubicina, y tratamiento a altas dosis de dexametasona (VAD), talidomida, velcade u otros regímenes de quimioterapia conocidos por los expertos en la técnica.

Ejemplo 15: Reducción *in vivo* de IgG por anticuerpo anti-CS1 humanizado en un modelo de ratón SCID-HuCMSP*Modelo de ratón SCID-HuCMSP*

Células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) se aislaron por de gradientes de densidad Ficoll-paquete estándar (Amersham Biosciences) y se volvieron a poner en suspensión en solución tamponada con fosfato (PBS) a 2×10^7 CMSP/ml. CMSP de nuevo en suspensión (1 ml) se inyectaron por vía intraperitoneal (ip) en ratones CB-17 SCID. Dos a tres semanas después de la inyección de CMSP, se extrajeron muestras de suero de los ratones y se analizó la Igλ humana por ELISA. Los ratones injertados (que producen >1 µg/ml de Igλ humana en el suero) se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento y a continuación se trataron con Luc63 humanizada (HuLuc63), o anticuerpos de control de isotipo IgG1 humanos. A los ratones se les administraron dosis con 200 µg de anticuerpo en 500 µl de PBS cada 3 a 4 días con 4 dosis de anticuerpo. En el suero de ratón se analizó Igλ humana por ELISA

utilizando protocolos estándar. Mediante la detección de Igλ humana, los autores cuantificaron la inmunoglobulina producida por los linfocitos B humanos inyectados, a diferencia de los anticuerpos humanos humanizados y de control utilizados para tratar los ratones, ya que los anticuerpos humanizados tienen cadenas ligeras kappa y no cadenas ligeras lambda.

Se calculó el porcentaje de cambio en Igλ humana de suero para cada ratón restando la concentración de Igλ humana antes de la primera dosis de anticuerpo (día 0) de la concentración de Igλ humana después de la dosis (día x), dividiendo por la concentración de Igλ humana antes de la primera dosis (día 0), y multiplicando por 100, por ejemplo, $[(\text{día } x - \text{día } 0)/\text{día } 0] \times 100$. Los datos se muestran como el cambio porcentual media con la desviación estándar para cada grupo de ratones, comparando el día 0 con el día 14 del estudio.

El anticuerpo anti-CS1 humanizado redujo la producción de inmunoglobulina humana in vivo

Los datos demuestran que los anticuerpos anti-CS1 de la presente invención reducen sustancialmente la producción de inmunoglobulina humana en el modelo de transferencia de SCID-HuCMSP. En el modelo, hay un aumento de ~300% en la producción de inmunoglobulina intrínseca al modelo como se aprecia en los ratones tratados con control de isotipo. HuLuc63 suprimió el incremento ~300% en la producción de inmunoglobulina y produjo una disminución adicional de 2% en inmunoglobulina. Por lo tanto, se puede concluir que, de forma similar al tratamiento con la anti-CS1 humana en ratón, el tratamiento con anticuerpo anti-CS1 Luc63 humanizado de los ratones SCID injertados con CMSP humanas (SCID-HuCMSP) no sólo suprime completamente el aumento de la inmunoglobulina humana normalmente observado en el suero de estos animales, sino que también proporciona una disminución adicional en comparación con los niveles de pretratamiento. Por lo tanto, un anticuerpo anti-CS1 humanizado proporcionará un agente terapéutico útil en un paciente humano con una enfermedad asociada a la producción de inmunoglobulinas humanas.

Ejemplo 16: Anticuerpos monoclonales anti-CS1 y anti-CS1 humanizados adicionales

Se clonaron regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpos utilizando técnicas estándar. En resumen, el ARN completo de $1-5 \times 10^6$ células se utilizó para preparar ADNc utilizando un kit de ampliación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences Clontech) y las regiones variables se ampliaron por RCP utilizando cebadores génicos específicos complementarios de las regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de ratón.

Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada madura y de la cadena ligera madura de los anticuerpos Luc69, LucX.1 y LucX.2 se muestran en la Tabla 9 que proporciona secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 51) y de la región variable de cadena ligera (SEC. ID. nº 52) de Luc69; las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 59) y de la región variable de la cadena ligera (SEC. ID. nº 60) de LucX.1, las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (SEC. ID. nº 66) y de la región variable de la cadena ligera (SEC. ID. nº 67) de LucX.2. Las SEC. ID. nº 53, nº 54 y nº 55 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc69. Las SEC. ID. nº 56, nº 57 y nº 58 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc69. Las SEC. ID. nº 61, nº 62 y nº 63 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de LucX.1. Las SEC. ID. nº 64, nº 65 y nº 66, representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de LucX.1. Las SEC. ID. nº 69, nº 70 y nº 71 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de LucX.2. Las SEC. ID. nº 72, nº 73 y nº 74, representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de LucX.2.

Tabla 9 secuencias de aminoácidos de anticuerpos Luc69 y LucX de CS1

Luc69 VH – SEC ID nº: 51

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSNSWMNWVKQRPQGLEWIGRIYPGDGDTSKNSG
KF

SEC ID nº: 53

SEC ID nº:

54

KGKATLTADKSSRAAYMQLSSLTSVDSAVYFCARSTMIMTGAMDYWGQTSVTVSS

SEC ID nº: 55

Luc69 VL – SEC ID nº: 52

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVIIITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASFRTYTGVPDRF
TG

SEC ID nº: 56

SEC ID nº: 57

SGSGTDFTFVSSVQAEDLAVYYCQQHYSTPPYTFGGGTKLEIK

SEC ID nº: 58

LucX.1 VH - SEC ID nº: 59

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPQGLEWIGRIYPGDGDTSKNSG
KF

SEC ID nº: 61

SEC ID nº:

62

KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARSTMIAITGAMDYWGQTSVTVSS

SEC ID nº: 63

LucX.1 VL - SEC ID nº: 60

ETTVTQSPASLSMAIGKVTIRCIITSTDIDDDMNWYQQKPGEPKLLISEGNTLRPGVPSRF
SS

SEC ID nº: 64

SEC ID nº: 65

SGYGTDFVFTIENMLSEDVADYYCLOSDNLPLTFGGGTKLEIK

SEC ID nº: 66

LucX.2 VH - SEC ID nº: 67

QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWVKQRPQGLEWIGRIYPGDGDTSKNSG
KF

SEC ID nº: 69

SEC ID nº:

70

KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARSTMIAITGAMDYWGQTSVTVSS

SEC ID nº: 71

LucX.2 VL - SEC ID nº: 68

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRTYTGVPDRF
TG

SEC ID nº: 72

SEC ID nº: 73

SGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPPYTFGGGTKLEIK

SEC ID nº: 74

5

Los anticuerpos Luc69, LucX.1 y LucX.2 en la Tabla 9, y Luc90 y Luc34 en la Tabla 4 serán humanizados según los procedimientos dados a conocer en Queen *et al.*, patentes US nº 5.530.101; nº 5.585.089; nº 5.693.761; nº 5.693.762 y nº 6.180.370.

- 10 En resumen, el procedimiento implica proporcionar una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una inmunoglobulina donante (ratón) y una región marco de una inmunoglobulina humana. Los procedimientos preferidos comprenden en primer lugar comparar el marco o la secuencia de aminoácidos de la región variable de las inmunoglobulina donante con las secuencias correspondientes en una colección de cadenas de inmunoglobulina humana, y seleccionar como inmunoglobulina humana una de las secuencias más homólogas de la colección. La
- 15 secuencia de inmunoglobulina humana, o inmunoglobulina receptora, se selecciona por lo general de una colección de al menos 10 a 20 o más secuencias de la región variable de inmunoglobulina, y por lo general tienen la mayor

homología con la secuencia de inmunoglobulina donante de cualquier secuencia en la colección. La secuencia marco de inmunoglobulina humana por lo general tendrá aproximadamente 65 a 70% de homología o más con las secuencias marco de inmunoglobulina donante. La inmunoglobulina donante puede ser una cadena pesada o una cadena ligera, y la colección humana contendrá el mismo tipo de cadena. Una cadena pesada y ligera humanizada se puede utilizar para formar una inmunoglobulina completa o anticuerpo humanizados, que tiene dos pares de cadenas ligera/pesada, con o sin regiones constantes humanas parciales o completas.

Para formar la región variable humanizada, los aminoácidos en la secuencia receptora humana se sustituirán por los correspondientes aminoácidos de la secuencia donante si se encuentran en la categoría: (1) el aminoácido se encuentra en una CDR ya sea junto con la etapa de comparación anterior o por separado, los aminoácidos adicionales en la cadena de inmunoglobulina receptora puede sustituirse por aminoácidos de la cadena de inmunoglobulina donante de CDR. Más específicamente, más sustituciones opcionales de un aminoácido marco humano de la inmunoglobulina receptora por el aminoácido correspondiente de una inmunoglobulina donante se harán en las posiciones que están comprendidas en una o más de las siguientes categorías: (2) el aminoácido en la región marco humana de la inmunoglobulina receptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es común para esa posición en secuencias de inmunoglobulina humana; o (3) el aminoácido está inmediatamente adyacente a una de los CDR; o (4) se prevé que el aminoácido sea capaz de interactuar con el antígeno o con las CDR de la inmunoglobulina donante o humanizada. Además, un aminoácido en la secuencia receptora puede estar opcionalmente sustituido con un aminoácido típico de secuencias humanas en esa posición si (5) el aminoácido en la inmunoglobulina receptora es raro para esa posición y el aminoácido correspondiente en la inmunoglobulina donante es también raro, con relativo a otras secuencias humanas.

Cuando se combinan en un anticuerpo intacto, las cadenas ligera y pesada humanizadas serán sustancialmente no inmunógenas en seres humanos y conservarán sustancialmente la misma afinidad que la inmunoglobulina donante a CS1.

Una vez diseñadas, las inmunoglobulinas, incluyendo fragmentos de unión y otras formas de inmunoglobulina se pueden producir fácilmente por una variedad de ADN recombinante u otras técnicas. Preferentemente, los polinucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos deseadas se producen por síntesis y uniendo secuencias apropiadas de ácido nucleico, con máxima expresión en las células transfectadas. Los anticuerpos monoclonales anti-CS1 humanizados serán particularmente útiles en el tratamiento de trastornos humanos susceptibles a la terapia de anticuerpos monoclonal, como se describe con detalle en la presente memoria.

Ejemplo 17: Secuencias de CS1 de otros primates.

Las secuencias de aminoácidos de los dominios extracelulares de CS1 de varios primates no humanos, incluyendo las del macaco cangrejero, chimpancé y macaco Rhesus se determinaron y compararon con la secuencia humana. La secuencia de Rhesus se determinó a partir de una muestra de CMSP activadas de un macaco Rhesus. La secuencia del chimpancé se determinó a partir de una muestra de CMSP que había sido estimulada previamente con OKT3. La secuencia del macaco cangrejero se determinó a partir de una muestra de CMSP activada a partir de un macaco cangrejero.

Se preparó ARN a partir de muestras de tejido utilizando reactivo Trizol LS (Invitrogen)/extracción de cloroformo, seguido de limpieza con microkit RNAeasy (Qiagen). La primera cadena de ADNc se preparó utilizando el SMART RACE (Clontech). RCP se llevó a cabo con cebadores diseñados ya sea para la secuencia publicada para cada especie o utilizando la secuencia humana si la secuencia específica de la especie no estaba disponible, para aislar fragmentos de las regiones de interés. Estos fragmentos se clonaron en el sistema de clonación TOPO (Invitrogen) para la secuenciación en el AB 3100 Genetic Analyzer.

Una vez determinada la secuencia específica de la especie los fragmentos requeridos se sometieron a RCP con cebadores de clonación que contienen las secuencias de restricción necesarias para los vectores de expresión. Los dominios extracelulares de cada especie se subclonaron en los vectores NEF39 HAPPFc Fc, NEF39 Fc o NIF Fc y ORF completo en vectores NEF39 HA ICD4. Las secuencias de aminoácidos se determinaron a partir de la traducción de las secuencias de ácidos nucleicos. La Tabla 10 (SEC. ID. nº 75, 76, 77 y 78) muestra la alineación de cada secuencia de macaco cangrejero, rhesus, ser humano y chimpancé, respectivamente. Las secuencias se alinean comenzando en metionina e incluyen los péptidos de señal respectivos. Los restos de aminoácidos homólogos en todas las especies se indican con un símbolo *.

Tabla 10. Alineación de secuencias de CS1 de primate (SEC. ID. nº 75-78)

macaco cangrejero	MAGSPTCFTFIYILWQLTGSTASGSVKELVGSIGGAVTFPLKSEVKQVDSIVWTFNNTTL	60
rhesus	MAGSPTCLTFIYILWQLTGSTASGSVKELVGSIGGAVTFPLKSEVKQVDSIVWTFNNTTL	60
ser humano	MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNNTPL	60
chimpancé	MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVRELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNNTPL	60
	*****;*:*****;***.*:*****;*****;*****;*****.*	
macaco cangrejero	VTIQPEGGPMIVTQNRNKERVHFDPGGYSLKLSKLKNDSGIYNVEIYSSSLQDPFTRKY	120
rhesus	VTIQPEGGPMIVTQNRNKERVHFDPGGYSLKLSKLKNDSGIYNVEIYSSSLQDPFTRKY	120
ser humano	VTIQPEGGTIIVTQNRNRERVDFFDPGGYSLKLSKLKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQY	120
chimpancé	VTIQPEGGTIIVTQNRNKERVDFFDPGGYSLKLSKLKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQKY	120
	*****.;*****;***.***** * *****;*:;*:	
macaco cangrejero	VLRVYEHLSPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAVNESHNGSIL	180
rhesus	VLRVYEHLSPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAVNESHNGSIL	180
ser humano	VLHVYEHLSPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSIL	180
chimpancé	VLHVYEHLSPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSIL	180
	*:*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****	
macaco cangrejero	PISWRWGESDMTFICTVRNPVSSNSSSPILARKLCEGAADDSDSSMV	
rhesus	PISWRWGESDMTFICTVRNPVSSNSSSPILARKLCEGAADDSDSSMV	
ser humano	PISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMV	
chimpancé	PISWRWGESDMTFICVARNPVSSNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMV	
	*****;*****.* ***** *****;*****;*****	

5 Ejemplo 18: Cartografía de epítomos de anticuerpos CS1

Se construyeron proteínas CS1-Fc híbridas humanas, de ratón o humana-ratón para evaluar su capacidad de unir diferentes anti-CS1 anticuerpos utilizando un ELISA intercalado. Se ha demostrado que el panel de anticuerpos anti-CS1 se unen a la proteína CS1 humana pero no la proteína CS1 de ratón.

10 Vectores de expresión de CS1

El dominio extracelular de CS1 humana (aminoácidos 1-227) se subclonó en el vector NIF Fc, y el dominio extracelular de CS1 de ratón (aminoácidos 1-224) se subclonó en el vector NEF39 Fc. Estos vectores generan una proteína de fusión del dominio extracelular de CS1 clonado corriente arriba y en marco con el gen de la cadena pesada de inmunoglobulina gamma 1 humana. Esto genera una proteína segregada que contiene el dominio extracelular de CS1 y una "etiqueta" de Fc humano en el terminal C.

20 RCP y secuenciación

Híbridos humano/ratón del dominio extracelular de CS1 se generaron por RCP utilizando cebadores híbridos que abarcan las uniones requeridas de las secuencias humanas y de ratón con los ADNc clonados previamente como fuente. Estos fragmentos se utilizaron en coser las RCP para coser los fragmentos junto con las secuencias de restricción requeridas para vectores de expresión. Estos fragmentos híbridos se clonaron en el sistema de clonación TOPO (Invitrogen) o directamente en el vector de expresión Fc NIF para la secuenciación en AB 3100 Genetic Analyzer. Los fragmentos de secuencia confirmados se subclonaron en el vector de expresión NIF Fc.

Los montajes híbridos son los siguientes, que contienen los aminoácidos indicados de CS1 humana y de ratón. Las secuencias se proporcionan en la Tabla 11.

hu25/mu75: aminoácidos 1-67 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 68-224 de CS1 de ratón (SEC. ID. nº 79);

mu25/hu75: aminoácidos 1-67 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 68-227 de CS1 humana (SEC. ID. nº 80);

hu50/mu50: aminoácidos 1-151 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 149-224 de CS1 de ratón (SEC. ID. nº 81);

mu50/hu50: aminoácidos 1-131 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 135-227 de CS1 humana (SEC. ID. nº 82);

hu75/mu25: aminoácidos 1-169 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 167-224 de CS1 de ratón (SEC. ID. nº 83);

mu75/hu25: aminoácidos 1-166 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 170-227 de CS1 humana (SEC. ID. nº 84).

Tabla 11 Secuencias de aminoácidos de proteínas CS1 híbridas

5

hu25%/mu75% (SEC ID nº: 79)
 MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPL
 VTIQPEGVTSQSSNKERIVFPDGLYSMKLSQLKKNDGAYRAEIYSTSSQASLIQEYVLH
 VYKHLRSPKVTIDRQSNKNGTCVINLTCSTDQDGENVTYSWKAVGQGDNQFHDGATLSIA
 WRSGEKDQALTCMARNPVSNFSFSTPVFPQKLCEDAATDLTSLRG
 mu25%/hu75% (SEC ID nº: 80)
 MARFSTYIIIFTSVLCQLTVTAASGTLKKVAGALDGSVTFNITEIKVDYVWTFNTFFL
 AMVKKDGGTIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEY
 VLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSIL
 PISWRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMV
 hu50%/mu50% (SEC ID nº: 81)
 MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPL
 VTIQPEGGTIIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEY
 VLHVYEHLSKPKVTIDRQSNKNGTCVINLTCSTDQDGENVTYSWKAVGQGDNQFHDGATL
 SIAWRSGEKDQALTCMARNPVSNFSFSTPVFPQKLCEDAATDLTSLRG
 mu50%/hu50% (SEC ID nº: 82)
 MARFSTYIIIFTSVLCQLTVTAASGTLKKVAGALDGSVTFNITEIKVDYVWTFNTFFL
 AMVKKDGVTSQSSNKERIVFPDGLYSMKLSQLKKNDGAYRAEIYSTSSQASLIQEYVLH
 VYKHLRSPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPIS
 WRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMV
 hu75%/mu25% (SEC ID nº: 83)
 MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNTTPL
 VTIQPEGGTIIIVTQNRNRERVDFPDGGYSLKLSKLKKNDSGIYYVGIYSSSLQQPSTQEY
 VLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCVTNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQGDNQFHDGATL
 SIAWRSGEKDQALTCMARNPVSNFSFSTPVFPQKLCEDAATDLTSLRG
 mu75%/hu25% (SEC ID nº: 84)
 MARFSTYIIIFTSVLCQLTVTAASGTLKKVAGALDGSVTFNITEIKVDYVWTFNTFFL
 AMVKKDGVTSQSSNKERIVFPDGLYSMKLSQLKKNDGAYRAEIYSTSSQASLIQEYVLH
 VYKHLRSPKVTIDRQSNKNGTCVINLTCSTDQDGENVTYSWKAVGQAANESHNGSILPIS
 WRWGESDMTFICVARNPVSRNFSSPILARKLCEGAADDPDSSMV

Transfección transitoria

10 Se colocaron en placas células 293/T a razón de 2×10^5 células por pocillo en placas de 6 pocillos. 24 horas más tarde, se mezclaron 0,15 pmol de ADN con FuGene6 (Roche) según las instrucciones del fabricante y se añadieron a las células. 24 horas después, las células se transfirieron a matraces T75 que contienen 12 ml de medio con Ultra-low IgG Serum (Invitrogen). 3 días después, se recogió el sobrenadante y se confirmó y cuantificó la presencia de la proteína de fusión CS1-Fc detectando la etiqueta de Fc por ELISA.

15 *ELISA para cartografiar epítomos*

20 Se evaluó la capacidad para unirse a diferentes anti-CS1 de anticuerpos de las proteínas CS1-Fc humanas, de ratón o humana-ratón híbridas, utilizando un ELISA intercalado. El anticuerpo de captura, anti-gamma humano (Jackson Immunological) se ligó durante toda la noche a una placa de ELISA (Immulon 4 HBX - ThermoLabSystems) en tampón de carbonato a 1,8 µg/ml. Después del bloqueo, 100 µl de sobrenadante de células 293/T transfectadas con los montajes de CS1 se incubaron a 37°C durante una hora, seguido de incubación con anticuerpos anti-CS1 a 2 µg/ml. Anticuerpos anti-ratón, conjugados con peroxidasa de rábano picante, se incubaron a continuación a 0,5 µg/ml y posteriormente se detectaron con 3,3', 5,5'-tetrametilbencidina (Sigma). Cada ensayo se realizó al menos dos veces con dos transfecciones diferentes.

25 Previamente, se ha determinado que los anticuerpos de CS1 se unen a CS1 humana pero no a CS1 de ratón. Sin embargo, los dominios extracelulares de CS1 de las dos especies son lo suficientemente similares como para permitir la producción de híbridos entre CS1 humana y de ratón para localizar las regiones de la proteína a la que se unen los anticuerpos. Los montajes de expresión que contienen híbridos de los dominios extracelulares de CS1 humana y de ratón se transfectaron en células 293/T y se evaluó su capacidad para unirse a anticuerpos de CS1. Como se esperaba, los anticuerpos de CS1 se unieron a la CS1 humana pero no a la CS1 de ratón y resultó que caen en 3 grupos de epítomos diferentes (Tabla 12).

30

**Tabla 12. Cartografía de epítomos de anticuerpos de CS1
montaje**

Anticuerpo	Vector NIF Fc	huCS1	muCS1	hu25/ mu75	mu25/ hu75	hu50/ mu50	mu50/ hu50	hu75/ mu25	mu75/ hu2S
Luc34	-	+	-	-	-	+	-	+	-
LucX	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Luc69	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Luc90	-	+	-	-	-	+	-	+	-
Luc5	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Luc38	-	+	-	-	+	+	-	+	-
Luc4	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc12	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc23	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc29	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc32	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc37	-	+	-	-	+	-	+	-	+
Luc63	-	+	-	-	+	-	+	-	+

Los anticuerpos de CS1 Luc34, LucX, Luc69 y Luc90 se unen a hu50/mu50, que contiene los primeros 151 aminoácidos de CS1 humana y la segunda mitad de CS1 de ratón. Por lo tanto, estos anticuerpos se unen en la primera mitad del dominio extracelular de CS1 humana. Sin embargo, ninguno de los anticuerpos se unen a hu25/mu75, que contiene los primeros 67 aminoácidos de CS1 humana o mu25/hu75, que contiene los aminoácidos 68-227 de CS1 humana. Así pues, los epítomos para estos anticuerpos se superponen a ambas de estas regiones y potencialmente podrían encontrarse en la unión de estos montajes, en los aminoácidos 67 a 68. Los anticuerpos Luc5 y Luc38 de CS1 unen tanto a hu50/mu50, que contiene los primeros 151 aminoácidos de CS1 humana, como a mu25/hu75, que contienen los aminoácidos 68-227 de CS1 humana. Por lo tanto, estos anticuerpos se unen entre los aminoácidos 68-151 de CS1 humana. La región más pequeña de CS1 humana demostró que Luc4, Luc12, Luc23, Luc29, Luc32, Luc37 y Luc63 se unen a mu75/hu25. Por lo tanto, estos anticuerpos se unen a 58 aminoácidos del terminal C del dominio de CS1 humana.

Este estudio ha agrupado los puntos de unión de anticuerpos de CS1 en 3 grupos de epítomos:

- (1) Epítomo definido por Luc90, que se une a hu50/mu50 (SEC. ID. nº 81). Este epítomo abarca desde aproximadamente el resto de aminoácido 23 hasta aproximadamente el resto de aminoácido 151 de CS1 humana. Este epítomo reside en el dominio 1 (dominio V) del dominio extracelular. Este epítomo es reconocido también por Luc34, LucX (incluyendo LucX.1 y LucX.2) y Luc69.
- (2) Epítomo definido por Luc38, que se une a mu25/hu75 (SEC. ID. nº 80) y hu50/mu50 (SEC. ID. nº 81). Este epítomo probablemente abarca desde aproximadamente el resto de aminoácido 68 hasta aproximadamente el resto de aminoácido 151 de CS1 humana. Este epítomo es reconocido también por Luc5.
- (3) Epítomo definido por Lu 63, que se une a mu75/hu25 (SEC. ID. nº 84). Este epítomo abarca desde aproximadamente el resto de aminoácido 170 hasta aproximadamente el resto de aminoácido 227 de CS1 humana. Este epítomo reside en el dominio 2 (dominio C2) de CS1 humana. Este epítomo es reconocido también por Luc4, Luc12, Luc23, Luc29, Luc32 y Luc37.

Se entiende que los ejemplos descritos anteriormente de ningún modo sirven para limitar el verdadero alcance de esta invención, sino que más bien se presentan a título ilustrativo.

Párrafos pertinentes:

1. Anticuerpo o fragmento del mismo que se une al antígeno, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a un epítopo de CS1 humana reconocida por Luc 90.
2. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a un dominio V de dicha CS1 humana.
3. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a dicho epítopo de CS1 humana codificado en la SEC. ID. nº 81.
4. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento inhibe la secreción de inmunoglobulinas a partir de una célula que segrega inmunoglobulina.

5. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo desencadena efectos citotóxicos sobre las células que expresan CS1 o aumenta la citotoxicidad en la que intervienen inmunocitos.
- 5 6. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 5, en el que dicho anticuerpo desencadena citotoxicidad de células que expresan CS1, en la que interviene CCDA.
7. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 9, nº 10, nº 11, nº 12, nº 13 y nº 14.
- 10 8. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 21, nº 22, nº 23, nº 24, nº 25 y nº 26.
- 15 9. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 53, nº 54, nº 55, nº 56, nº 57 y nº 58.
- 20 10. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 61, nº 62, nº 63, nº 64, nº 65 y nº 66.
- 25 11. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 1, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 69, nº 70, nº 71, nº 72, nº 73 y nº 74.
12. Anticuerpo de los párrafos 7, 8, 9, 10 u 11, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo completamente humano.
- 30 13. Anticuerpo o fragmento del mismo que se une al antígeno, en el que dicho anticuerpo se une a un epítipo de CS1 humana reconocido por Luc 63.
14. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a un dominio C2 de dicha CS1 humana.
- 35 15. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento se une a dicho epítipo de CS1 humana codificado en la SEC. ID. nº 84.
16. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento inhibe la secreción de inmunoglobulina a partir de una célula que segrega inmunoglobulina.
- 40 17. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 13, en el que dicho anticuerpo desencadena efectos citotóxicos sobre células que expresan CS1 o aumenta la citotoxicidad en la que intervienen inmunocitos.
- 45 18. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 17, en el que dicho anticuerpo desencadena citotoxicidad de células que expresan CS1, en la que interviene CCDA.
19. Anticuerpo o fragmento que se une al antígeno del párrafo 13, en el que dicho anticuerpo o fragmento comprende una región determinante de complementariedad (CDR) de un anticuerpo seleccionado de entre un grupo que consiste en las SEC. ID. nº 15, nº 16, nº 17, nº 18, nº 19 y nº 20.
- 50 20. Anticuerpo del párrafo 19, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo híbrido o un anticuerpo completamente humano.
- 55 21. Composición farmacéutica que comprende un excipiente farmacéutico y el anticuerpo del párrafo 1 ó 13.
22. Procedimiento para destruir células que expresan CS que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad eficaz del anticuerpo del párrafo 1 ó 13.
- 60 23. Procedimiento del párrafo 22, en el que dichas células que expresan CS1 son células cancerosas de células plasmáticas.
24. Procedimiento del párrafo 23, en el que dichos cánceres de células plasmáticas se seleccionan de entre un grupo que consiste en mieloma múltiple, mieloma de huesos, plasmacitoma extramedular, macroglobulinemia, enfermedad de cadenas pesadas, amiloidosis primaria y gammapatía monoclonal de significado incierto.
- 65

25. Procedimiento del párrafo 22, en el que dichas células que expresan CS1 proceden de las células cancerosas de células no plasmáticas.
- 5 26. Procedimiento del párrafo 25, en el que dicho cáncer de células no plasmáticas es la leucemia linfocítica crónica.
27. Procedimiento del párrafo 22, en el que dichas células que expresan CS proceden de los leucocitos.
28. Procedimiento del párrafo 27, en el que dicho leucocitos son linfocitos B o linfocitos T activados.
- 10 29. Procedimiento del párrafo 28, en el que dicho leucocitos proceden de un paciente que padece LED.
30. Procedimiento del párrafo 22, en el que dicho anticuerpo ha disminuido las concentraciones de fucosa o ha mutado para aumentar la afinidad del anticuerpo por un receptor de FcyR.
- 15 31. Procedimiento para tratar a un paciente con cáncer de células plasmáticas que comprende administrar el anticuerpo del párrafo 1 ó 13.
32. Procedimiento para tratar un individuo con artritis reumatoide que comprende administrar el anticuerpo del párrafo 1 ó 13.
- 20 33. Procedimiento para tratar un individuo con enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar el anticuerpo del párrafo 1 ó 13.
- Listado de secuencias**
- 25 <110> Facet Biotech Corporation
- <120> Utilización terapéutica de anticuerpos anti-CS1
- 30 <130> 381828-11ST1 (101900)
- <140> 10982357
- <141> 2004-11-05
- 35 <160> 85
- <170> PatentIn versión 3.2
- <210> 1
- 40 <211> 2672
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 393 539 T3

cttccagaga gcaatatggc tggttcccca acatgcctca ccctcatcta tatcctttgg	60
cagctcacag ggtcagcagc ctctggaccc gtgaaagagc tggtcggttc cgttggtggg	120
gccgtgactt tccccctgaa gtccaaagta aagcaagttg actctattgt ctggaccttc	180
aacacaaccc ctcttgctac catacagcca gaagggggca ctatcatagt gacccaaaat	240
cgtaataggg agagagtaga cttcccagat ggaggctact ccctgaagct cagcaaaactg	300
aagaagaatg actcagggat ctactatgtg gggatataca gctcatcact ccagcagccc	360
tccaccagg agtacgtgct gcatgtctac gagcacctgt caaagcctaa agtcaccatg	420
ggtctgcaga gcaataagaa tggcacctgt gtgaccaatc tgacatgctg catggaacat	480
ggggaagagg atgtgattta tacctggaag gccctggggc aagcagccaa tgagtcccat	540
aatgggtcca tcctcccat ctcttggaaga tggggagaaa gtgatatgac cttcatctgc	600
gttgccagga accctgtcag cagaaacttc tcaagcccca tccttgccag gaagctctgt	660
gaaggtgctg ctgatgaccc agattcctcc atggtcctcc tgtgtctcct gttggtgccc	720
ctcctgtcga gtctctttgt actggggcta tttcttttgt ttctgaagag agagagacaa	780
gaagagtaca ttgaagagaa gaagagagtg gacatttgtc gggaaactcc taacatatgc	840
ccccattctg gagagaacac agagtacgac acaatccctc acactaatag aacaatccta	900
aaggaagatc cagcaaatac ggtttactcc actgtggaaa taccgaaaaa gatggaaaat	960
ccccactcac tgctcacgat gccagacaca ccaaggctat ttgcctatga gaatgttatc	1020
tagacagcag tgcactcccc taagtctctg ctcaaaaaaa aaacaattct cggcccaaag	1080
aaaacaatca gaagaattca ctgatttgac tagaaacatc aaggaagaat gaagaacgtt	1140
gacttttttc caggataaat tatctctgat gcttctttag atttaagagt tcataattcc	1200
atccactgct gagaaatctc ctcaaaacca gaagggttaa tcacttcac ccaaaaatgg	1260
gattgtgaat gtcagcaaac cataaaaaaa gtgcttagaa gtattcctat agaaatgtaa	1320
atgcaaggtc acacatatta atgacagcct gttgtattaa tgatggctcc aggtcagtg	1380
ctggagtttc attccatccc agggcttgga tgtaaggatt ataccaagag tcttgctacc	1440
aggagggcaa gaagaccaa acagacagac aagtcagca gaagcagatg cacctgacaa	1500
aaatggatgt attaatggc tctataaact atgtgcccag cactatgctg agcttacct	1560
aattggctag acgtgtgtc tgccctcatg aaattggctc caaatgaatg aactactttc	1620
atgagcagtt gtagcagggc tgaccacaga ttcccagagg gccaggtgtg gatccacagg	1680
acttgaaggt caaagttcac aaagatgaag aatcagggtg gctgaccatg tttggcagat	1740
actataatgg agacacagaa gtgtgcatgg cccaaggaca aggacctcca gccaggcttc	1800
atttatgcac ttgtgtgca aaagaaaagt ctagggttta aggtgtgtcc agaaccatc	1860
ccaataaaga gaccgagtct gaagtcacat tgtaaactca gtgtaggaga cttggagtca	1920
ggcagtgaga ctggtggggc acggggggca gtgggtactt gtaaaccctt aaagatggtt	1980
aattcattca atagatatat attaagaacc tatgcgggcc ggcatggtgg ctcacacctg	2040
taatcccagc actttgggag gccaaagggtg gtgggtcatc tgaggtcagg agttcaagac	2100
cagcctggcc aacatggtga aaccccatct ctactaaaga tacaaaaatt tgctgagcgt	2160
ggtggtgtgc acctgtaatc ccagctactc gagaggccaa ggcatgagaa tcgcttgaac	2220
ctgggaggtg gaggttgca tgagctgaga tggcaccact gactccggc ctaggcaacg	2280
agagcaaaac tccaatacaa acaaaaaaac aaacacctgt gctaggtcag tctggcacgt	2340
aagatgaaca tccctaccaa cacagagctc accatctctt atacttaagt gaaaaacatg	2400
gggaagggga aaggggaatg gctgcttttg atatgttccc tgacacatat cttgaatgga	2460
gacctcccta ccaagtgtg aaagtgttga aaaacttaat acaaatgct tgttgggcaa	2520
gaatgggatt gaggattatc ttctctcaga aaggcattgt gaaggaattg agccagatct	2580
ctctccctac tgcaaaaccc tattgtagta aaaaagctct ctttactatc ttaataaaac	2640
agatattgtg agattcaaaa aaaaaaaaaa aa	2672

<210> 2

<211> 335
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

Met	Ala	Gly	Ser	Pro	Thr	Cys	Leu	Thr	Leu	Ile	Tyr	Ile	Leu	Trp	Gln
1				5					10					15	
Leu	Thr	Gly	Ser	Ala	Ala	Ser	Gly	Pro	Val	Lys	Glu	Leu	Val	Gly	Ser
		20						25					30		
Val	Gly	Gly	Ala	Val	Thr	Phe	Pro	Leu	Lys	Ser	Lys	Val	Lys	Gln	Val
	35						40					45			
Asp	Ser	Ile	Val	Trp	Thr	Phe	Asn	Thr	Thr	Pro	Leu	Val	Thr	Ile	Gln
50						55					60				
Pro	Glu	Gly	Gly	Thr	Ile	Ile	Val	Thr	Gln	Asn	Arg	Asn	Arg	Glu	Arg
65				70					75					80	
Val	Asp	Phe	Pro	Asp	Gly	Gly	Tyr	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Lys	Leu	Lys
			85						90					95	
Lys	Asn	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Val	Gly	Ile	Tyr	Ser	Ser	Ser	Leu
		100						105					110		
Gln	Gln	Pro	Ser	Thr	Gln	Glu	Tyr	Val	Leu	His	Val	Tyr	Glu	His	Leu
		115					120					125			
Ser	Lys	Pro	Lys	Val	Thr	Met	Gly	Leu	Gln	Ser	Asn	Lys	Asn	Gly	Thr
	130					135					140				
Cys	Val	Thr	Asn	Leu	Thr	Cys	Cys	Met	Glu	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Val
145				150						155				160	
Ile	Tyr	Thr	Trp	Lys	Ala	Leu	Gly	Gln	Ala	Ala	Asn	Glu	Ser	His	Asn
			165					170						175	
Gly	Ser	Ile	Leu	Pro	Ile	Ser	Trp	Arg	Trp	Gly	Glu	Ser	Asp	Met	Thr
		180					185						190		
Phe	Ile	Cys	Val	Ala	Arg	Asn	Pro	Val	Ser	Arg	Asn	Phe	Ser	Ser	Pro
	195						200					205			
Ile	Leu	Ala	Arg	Lys	Leu	Cys	Glu	Gly	Ala	Ala	Asp	Asp	Pro	Asp	Ser
	210					215					220				
Ser	Met	Val	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Pro	Leu	Leu	Leu	Ser	Leu
225					230					235					240
Phe	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Leu	Trp	Phe	Leu	Lys	Arg	Glu	Arg	Gln	Glu
			245					250						255	
Glu	Tyr	Ile	Glu	Glu	Lys	Lys	Arg	Val	Asp	Ile	Cys	Arg	Glu	Thr	Pro
		260						265					270		
Asn	Ile	Cys	Pro	His	Ser	Gly	Glu	Asn	Thr	Glu	Tyr	Asp	Thr	Ile	Pro
	275						280					285			
His	Thr	Asn	Arg	Thr	Ile	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ala	Asn	Thr	Val	Tyr
	290					295					300				
Ser	Thr	Val	Glu	Ile	Pro	Lys	Lys	Met	Glu	Asn	Pro	His	Ser	Leu	Leu
305					310					315					320
Thr	Met	Pro	Asp	Thr	Pro	Arg	Leu	Phe	Ala	Tyr	Glu	Asn	Val	Ile	
			325					330						335	

10

<210> 3
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

15

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Thr Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 4

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

<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 5

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

<210> 6
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 6

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

<210> 7
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Lys Val Tyr Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 8

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

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 9

Thr Tyr Trp Met Asn
1 5

<210> 10
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 10

Met Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Mus Musculus

 <400> 11
 Ser Thr Met Ile Ala Thr Arg Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 15
 <400> 12
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ile Thr Gly Val Ala
 1 5 10
 20
 <210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 25
 <400> 13
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5
 30
 <210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 14
 35
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 5
 40 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 15
 Arg Tyr Trp Met Ser
 1 5
 45
 <210> 16
 <211> 17
 <212> PRT
 50 <213> Mus Musculus
 <400> 16
 Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 55 Asp
 <210> 17
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 60
 <400> 17

Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

5 <210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus Musculus

10 <400> 18

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Ala Val Ala
1 5 10

15 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 19

20 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
25 <213> Mus Musculus

<400> 20

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus Musculus

35 <400> 21

Ser Tyr Trp Met Gln
1 5

40 <210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus Musculus

45 <400> 22

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

50 <210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 23

55 Gly Lys Val Tyr Tyr Gly Ser Asn Pro Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 24
<211> 11

<212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 24

5 Lys Ala Ser Asp His Ile Asn Asn Trp Leu Ala
 1 5 10

<210> 25

<211> 7

10 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 25

15 Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr
 1 5

<210> 26

<211> 9

20 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 26

25 Gln Gln Tyr Trp Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5

<210> 27

<211> 137

<212> PRT

30 <213> Mus Musculus
 <400> 27

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15

Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30

Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45

Arg Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 50 55 60

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
 65 70 75 80

Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr
 100 105 110

Tyr Cys Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly
 115 120 125

Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 130 135

35 <210> 28

<211> 127

<212> PRT

40 <213> Mus Musculus
 <400> 28

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15
Gly Val Glu Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30
Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45
Val Gly Ile Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60
Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95
Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser
100 105 110
Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 29
<211> 18
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 29

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
1 5 10 15

Gln cys

<210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 30

Arg Tyr Trp Met Ser
1 5

<210> 31
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 31

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

Asp

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 32

Pro Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

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

<213> Mus Musculus

<400> 33

5 Asn Tyr Ala
1

<210> 34
<211> 20
<212> PRT

10 <213> Mus Musculus

<400> 34

Met Glu Thr His Ser Gln Val Phe Val Tyr Met Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Glu Gly
 20

15 <210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus Musculus

20 <400> 35

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Ile Ala Val Ala
1 5 10

25 <210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus Musculus

30 <400> 36

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

35 <210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 37

40 Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 38
<211> 119
<212> PRT

45 <213> Mus Musculus

<400> 38

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

<210> 39
<211> 44
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 39

10 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Trp Val
20 25 30
Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
35 40

<210> 40
<211> 32
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 40

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15
20 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
25 30

<210> 41
<211> 119
<212> PRT
25 <213> Homo sapiens
<400> 41

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

<210> 42
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 42

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

<210> 43
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44

<211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 44

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

10 <210> 45
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

15 <400> 45

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

20 <210> 46
 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 46

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

<210> 47
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47

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

<210> 48
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus

<400> 48

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

<210> 49
<211> 80
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49

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

<210> 50
<211> 107
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

<210> 51
<211> 120
<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 51

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 52

<211> 108

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 52

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 53

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 53

Asn Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus Musculus

<400> 54

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Ser Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 gly
 <210> 55
 <211> 11
 5 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 55
 10 Ser Thr Met Ile Met Thr Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 56
 <211> 11
 15 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 56
 20 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 57
 <211> 7
 25 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 57
 30 Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 35 <400> 58
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10
 40 <210> 59
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 45 <400> 59

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 60
<211> 107
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 60

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

<210> 61
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 61

Ser Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 62

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 63
 <211> 11
 <212> PRT
 5 <213> Mus Musculus

 <400> 63
 Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 15
 <400> 64
 Ile Thr Ser Thr Asp Ile Asp Asp Asp Met Asn
 1 5 10
 20
 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 25
 <400> 65
 Glu Gly Asn Thr Leu Arg Pro
 1 5
 30
 <210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 66
 35
 Leu Gln Ser Asp Asn Leu Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 67
 <211> 120
 40 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 67
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 45 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 68
<211> 108
5 <212> PRT
<213> Mus Musculus

<400> 68

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80

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

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

<210> 69
<211> 5
<212> PRT
15 <213> Mus Musculus

<400> 69

Ser Ser Trp Met Asn
1 5

20 <210> 70
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus Musculus

25 <400> 70

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Lys Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

30 <210> 71
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus Musculus

35 <400> 71

Ser Thr Met Ile Ala Thr Gly Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 72

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 5 <400> 72
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 73
 10 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 73
 15 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 74
 <211> 10
 20 <212> PRT
 <213> Mus Musculus
 <400> 74
 25 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Pro Tyr Thr
 1 5 10
 <210> 75
 <211> 227
 <212> PRT
 30 <213> Macaca fascicularis
 <400> 75
 Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Phe Thr Phe Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Gly Ser Thr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
 20 25 30
 Ile Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Glu Val Lys Gln Val

35 40 45
 Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Thr Leu Val Thr Ile Gln
 50 55 60
 Pro Glu Gly Gly Pro Met Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Lys Glu Arg
 65 70 75 80
 Val His Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
 85 90 95
 Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Asn Val Glu Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Asp Pro Phe Thr Arg Lys Tyr Val Leu Arg Val Tyr Glu His Leu
 115 120 125
 Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
 130 135 140
 Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
 145 150 155 160
 Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Val Asn Glu Ser His Asn
 165 170 175
 Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
 180 185 190
 Phe Ile Cys Thr Val Arg Asn Pro Val Ser Ser Asn Ser Ser Ser Pro
 195 200 205
 Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Ser Asp Ser
 210 215 220
 Ser Met Val
 225

<210> 76
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Macaca mulatta

<400> 76

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Phe Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
 1 5 10 15
 Leu Thr Gly Ser Thr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
 20 25 30
 Ile Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Glu Val Lys Gln Val
 35 40 45

Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Thr Leu Val Thr Ile Gln
50 55 60

Pro Glu Gly Gly Pro Met Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Lys Glu Arg
65 70 75 80

Val His Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85 90 95

Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Asn Val Glu Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100 105 110

Gln Asp Pro Phe Thr Arg Lys Tyr Val Leu Arg Val Tyr Glu His Leu
115 120 125

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

Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys His Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145 150 155 160

Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Val Asn Glu Ser His Asn
165 170 175

Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180 185 190

Phe Ile Cys Thr Val Arg Asn Pro Val Ser Ser Asn Ser Ser Ser Pro
195 200 205

Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Ser Asp Ser
210 215 220

Ser Met Val
225

<210> 77
<211> 227
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1 5 10 15

Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
20 25 30

Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
35 40 45

10

Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
50 55 60
Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
65 70 75 80
Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85 90 95
Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100 105 110
Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
115 120 125
Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
130 135 140
Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145 150 155 160
Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
165 170 175
Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180 185 190
Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro
195 200 205
Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser
210 215 220
Ser Met Val
225

<210> 78
<211> 227
5 <212> PRT
<213> Pan troglodytes

<400> 78

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1 5 10 15
Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Arg Glu Leu Val Gly Ser
20 25 30
Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
35 40 45

10

Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
50 55 60

Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Lys Glu Arg
65 70 75 80

Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85 90 95

Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100 105 110

Gln Gln Pro Ser Thr Gln Lys Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
115 120 125

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

Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145 150 155 160

Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
165 170 175

Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180 185 190

Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Ser Asn Phe Ser Ser Pro
195 200 205

Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser
210 215 220

Ser Met Val
225

<210> 79

<211> 224

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> hu25/mu75: aminoácidos 1-67 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 68-224 de CS1 ratón

<400> 79

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1 5 10 15

Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
20 25 30

Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val

35 40 45

Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
50 55 60

Pro Glu Gly Val Thr Ser Gln Ser Ser Asn Lys Glu Arg Ile Val Phe
65 70 75 80

Pro Asp Gly Leu Tyr Ser Met Lys Leu Ser Gln Leu Lys Lys Asn Asp
85 90 95

Ser Gly Ala Tyr Arg Ala Glu Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Gln Ala Ser
100 105 110

Leu Ile Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Lys His Leu Ser Arg Pro
115 120 125

Lys Val Thr Ile Asp Arg Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr Cys Val Ile
130 135 140

Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asp Gln Asp Gly Glu Asn Val Thr Tyr Ser
145 150 155 160

Trp Lys Ala Val Gly Gln Gly Asp Asn Gln Phe His Asp Gly Ala Thr
165 170 175

Leu Ser Ile Ala Trp Arg Ser Gly Glu Lys Asp Gln Ala Leu Thr Cys
180 185 190

Met Ala Arg Asn Pro Val Ser Asn Ser Phe Ser Thr Pro Val Phe Pro
195 200 205

Gln Lys Leu Cys Glu Asp Ala Ala Thr Asp Leu Thr Ser Leu Arg Gly
210 215 220

<210> 80

<211> 227

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mu25/hu75: aminoácidos 1-67 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 68-227 de CS1 humana

<400> 80

Met Ala Arg Phe Ser Thr Tyr Ile Ile Phe Thr Ser Val Leu Cys Gln
1 5 10 15

Leu Thr Val Thr Ala Ala Ser Gly Thr Leu Lys Lys Val Ala Gly Ala
20 25 30

Leu Asp Gly Ser Val Thr Phe Thr Leu Asn Ile Thr Glu Ile Lys Val
35 40 45

Asp Tyr Val Val Trp Thr Phe Asn Thr Phe Phe Leu Ala Met Val Lys
50 55 60
Lys Asp Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
65 70 75 80
Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
85 90 95
Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
100 105 110
Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
115 120 125
Ser Lys Pro Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
130 135 140
Cys Val Thr Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val
145 150 155 160
Ile Tyr Thr Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn
165 170 175
Gly Ser Ile Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr
180 185 190
Phe Ile Cys Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro
195 200 205
Ile Leu Ala Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser
210 215 220
Ser Met Val
225

<210> 81

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> hu50/mu50: aminoácidos 1-151 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 149-224 de CS1 de ratón

<400> 81

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1 5 10 15
Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser
20 25 30

ES 2 393 539 T3

Val Gly Gly Ala Val Thr Phe Pro Leu Lys Ser Lys Val Lys Gln Val
 35 40 45
 Asp Ser Ile Val Trp Thr Phe Asn Thr Thr Pro Leu Val Thr Ile Gln
 50 55 60
 Pro Glu Gly Gly Thr Ile Ile Val Thr Gln Asn Arg Asn Arg Glu Arg
 65 70 75 80
 Val Asp Phe Pro Asp Gly Gly Tyr Ser Leu Lys Leu Ser Lys Leu Lys
 85 90 95
 Lys Asn Asp Ser Gly Ile Tyr Tyr Val Gly Ile Tyr Ser Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Gln Pro Ser Thr Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Glu His Leu
 115 120 125
 Ser Lys Pro Lys Val Thr Ile Asp Arg Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr
 130 135 140
 Cys Val Ile Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asp Gln Asp Gly Glu Asn Val
 145 150 155 160
 Thr Tyr Ser Trp Lys Ala Val Gly Gln Gly Asp Asn Gln Phe His Asp
 165 170 175
 Gly Ala Thr Leu Ser Ile Ala Trp Arg Ser Gly Glu Lys Asp Gln Ala
 180 185 190
 Leu Thr Cys Met Ala Arg Asn Pro Val Ser Asn Ser Phe Ser Thr Pro
 195 200 205
 Val Phe Pro Gln Lys Leu Cys Glu Asp Ala Ala Thr Asp Leu Thr Ser
 210 215 220
 Leu Arg Gly
 225

<210> 82

<211> 224

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> mu50/hu50: aminoácidos 1-131 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 135-227 de CS1 humana

<400> 82

Met Ala Arg Phe Ser Thr Tyr Ile Ile Phe Thr Ser Val Leu Cys Gln
 1 5 10 15

Leu Thr Val Thr Ala Ala Ser Gly Thr Leu Lys Lys Val Ala Gly Ala
20 25 30
Leu Asp Gly Ser Val Thr Phe Thr Leu Asn Ile Thr Glu Ile Lys Val
35 40 45
Asp Tyr Val Val Trp Thr Phe Asn Thr Phe Phe Leu Ala Met Val Lys
50 55 60
Lys Asp Gly Val Thr Ser Gln Ser Ser Asn Lys Glu Arg Ile Val Phe
65 70 75 80
Pro Asp Gly Leu Tyr Ser Met Lys Leu Ser Gln Leu Lys Lys Asn Asp
85 90 95
Ser Gly Ala Tyr Arg Ala Glu Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Gln Ala Ser
100 105 110
Leu Ile Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Lys His Leu Ser Arg Pro
115 120 125
Lys Val Thr Met Gly Leu Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr Cys Val Thr
130 135 140
Asn Leu Thr Cys Cys Met Glu His Gly Glu Glu Asp Val Ile Tyr Thr
145 150 155 160
Trp Lys Ala Leu Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn Gly Ser Ile
165 170 175
Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr Phe Ile Cys
180 185 190
Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro Ile Leu Ala
195 200 205
Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser Ser Met Val
210 215 220

<210> 83

<211> 227

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> hu75/mu25: aminoácidos 1-169 de CS1 humana fusionados a los aminoácidos 167-224 de CS1 de ratón

<400> 83

Met Ala Gly Ser Pro Thr Cys Leu Thr Leu Ile Tyr Ile Leu Trp Gln
1 5 10 15

Leu Thr Gly Ser Ala Ala Ser Gly Pro Val Lys Glu Leu Val Gly Ser

ES 2 393 539 T3

[illegible]

<210> 84
<211> 224
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> mu75/hu25: aminoácidos 1-166 de CS1 de ratón fusionados a los aminoácidos 170-227 de CS1 humana

<400> 84

Met Ala Arg Phe Ser Thr Tyr Ile Ile Phe Thr Ser Val Leu Cys Gln
1 5 10 15

Leu Thr Val Thr Ala Ala Ser Gly Thr Leu Lys Lys Val Ala Gly Ala
20 25 30

Leu Asp Gly Ser Val Thr Phe Thr Leu Asn Ile Thr Glu Ile Lys Val
35 40 45

Asp Tyr Val Val Trp Thr Phe Asn Thr Phe Phe Leu Ala Met Val Lys
50 55 60

Lys Asp Gly Val Thr Ser Gln Ser Ser Asn Lys Glu Arg Ile Val Phe
65 70 75 80

Pro Asp Gly Leu Tyr Ser Met Lys Leu Ser Gln Leu Lys Lys Asn Asp
85 90 95

Ser Gly Ala Tyr Arg Ala Glu Ile Tyr Ser Thr Ser Ser Gln Ala Ser
100 105 110

Leu Ile Gln Glu Tyr Val Leu His Val Tyr Lys His Leu Ser Arg Pro
115 120 125

Lys Val Thr Ile Asp Arg Gln Ser Asn Lys Asn Gly Thr Cys Val Ile
130 135 140

Asn Leu Thr Cys Ser Thr Asp Gln Asp Gly Glu Asn Val Thr Tyr Ser
145 150 155 160

Trp Lys Ala Val Gly Gln Ala Ala Asn Glu Ser His Asn Gly Ser Ile
165 170 175

Leu Pro Ile Ser Trp Arg Trp Gly Glu Ser Asp Met Thr Phe Ile Cys
180 185 190

Val Ala Arg Asn Pro Val Ser Arg Asn Phe Ser Ser Pro Ile Leu Ala
195 200 205

Arg Lys Leu Cys Glu Gly Ala Ala Asp Asp Pro Asp Ser Ser Met Val
210 215 220

<210> 85
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 85

Glu Ile Asn Pro Asp Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Ala Pro Ser Leu Lys
1 5 10 15

Asp

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o un fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su administración en combinación con Velcade para el tratamiento del mieloma múltiple, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 se une a una proteína codificada por la SEC. ID. nº 1, inhibe la secreción de inmunoglobulina y compite por unirse a dicha proteína con un anticuerpo de control, en el que el anticuerpo de control comprende una región VH que comprende la SEC. ID. nº 5 y una región VL que comprende la SEC. ID. nº 6.
2. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 hace descender por lo menos en un 50% en un ensayo de unión competitiva la unión del anticuerpo de control a la proteína.
3. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de la región determinante de complementariedad (CDR) que tienen secuencias de aminoácidos que comparten del 85% al 100% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 16 y la SEC. ID. nº 17.
4. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos que comparten del 85% al 100% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.
5. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 16 y la SEC. ID. nº 17, y una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.
6. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según la reivindicación 3 ó 4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID nº 5 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 6.
7. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 85 y la SEC. ID. nº 17; y una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.
8. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según la reivindicación 7, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 47 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 50.
9. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 7 u 8, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 está humanizado.
10. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 inhibe la secreción de inmunoglobulinas por lo menos un 40%.
11. Anticuerpo monoclonal anti-CS1 o fragmento que se une al antígeno anti-CS1 para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 es una IgG1.
12. Utilización de (a) un anticuerpo monoclonal anti-CS1 o un fragmento que se une al antígeno anti-CS1 y (b) velcade para la elaboración de un medicamento destinado al tratamiento del mieloma múltiple, en el que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 se une a una proteína codificada por la SEC. ID. nº 1, inhibe la secreción de inmunoglobulina y compite por unirse a dicha proteína con un anticuerpo de control, en el que el anticuerpo de control comprende una región VH que comprende la SEC. ID. nº 5 y una región

VL que comprende la SEC. ID. nº 6.

13. Utilización según la reivindicación 12, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 hace descender en por lo menos un 50% en un ensayo de unión competitiva la unión del anticuerpo de control a la proteína.

14. Utilización según la reivindicación 12 ó 13, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de región determinante de complementariedad (CDR) que tienen secuencias de aminoácidos que comparten del 85% al 100% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 16 y la SEC. ID. nº 17.

15. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos que comparten del 85% al 100% de identidad de secuencia con las secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.

16. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 16 y la SEC. ID. nº 17; y una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.

17. Utilización según las reivindicaciones 14 ó 15, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 5 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID nº 6.

18. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 comprende una región variable de cadena pesada con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 15, la SEC. ID. nº 16 y la SEC. ID. nº 17, y una región variable de cadena ligera con secuencias de CDR que tienen secuencias de aminoácidos representadas por la SEC. ID. nº 18, la SEC. ID. nº 19 y la SEC. ID. nº 20.

19. Utilización según la reivindicación 18, en la que el anticuerpo anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 tiene una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 47 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEC. ID. nº 50.

20. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 15, 18 ó 19, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 está humanizado.

21. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 20, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 inhibe la secreción de inmunoglobulinas por lo menos un 40%.

22. Utilización según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 21, en la que el anticuerpo monoclonal anti-CS1 o el fragmento que se une al antígeno anti-CS1 es una IgG1.

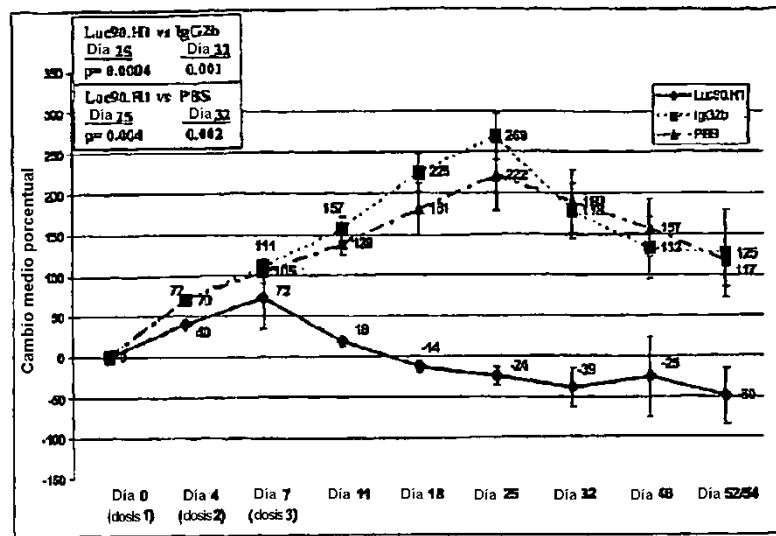


Figura 1A

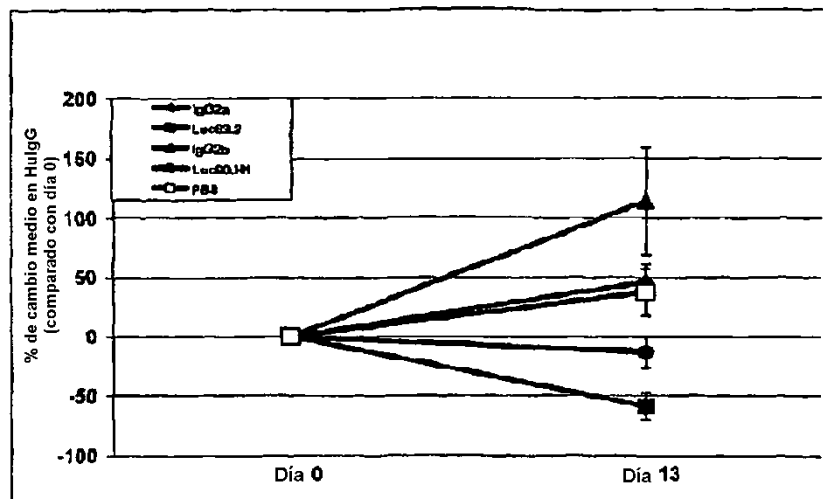


Figura 1B

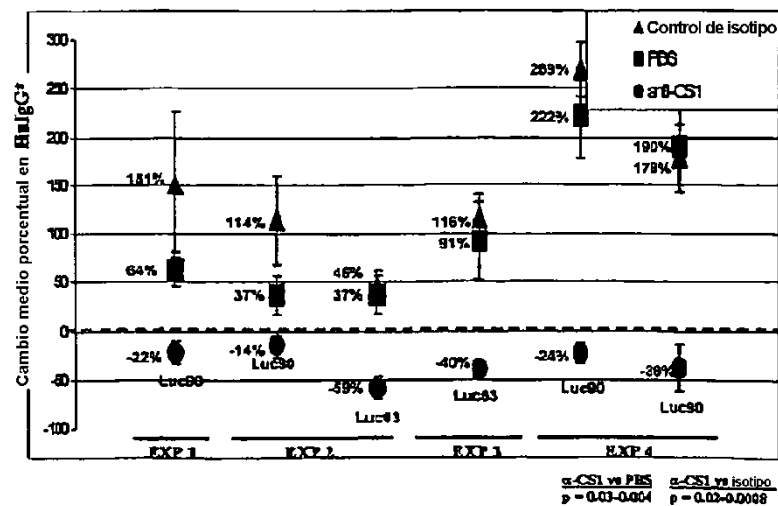


Figura 1C

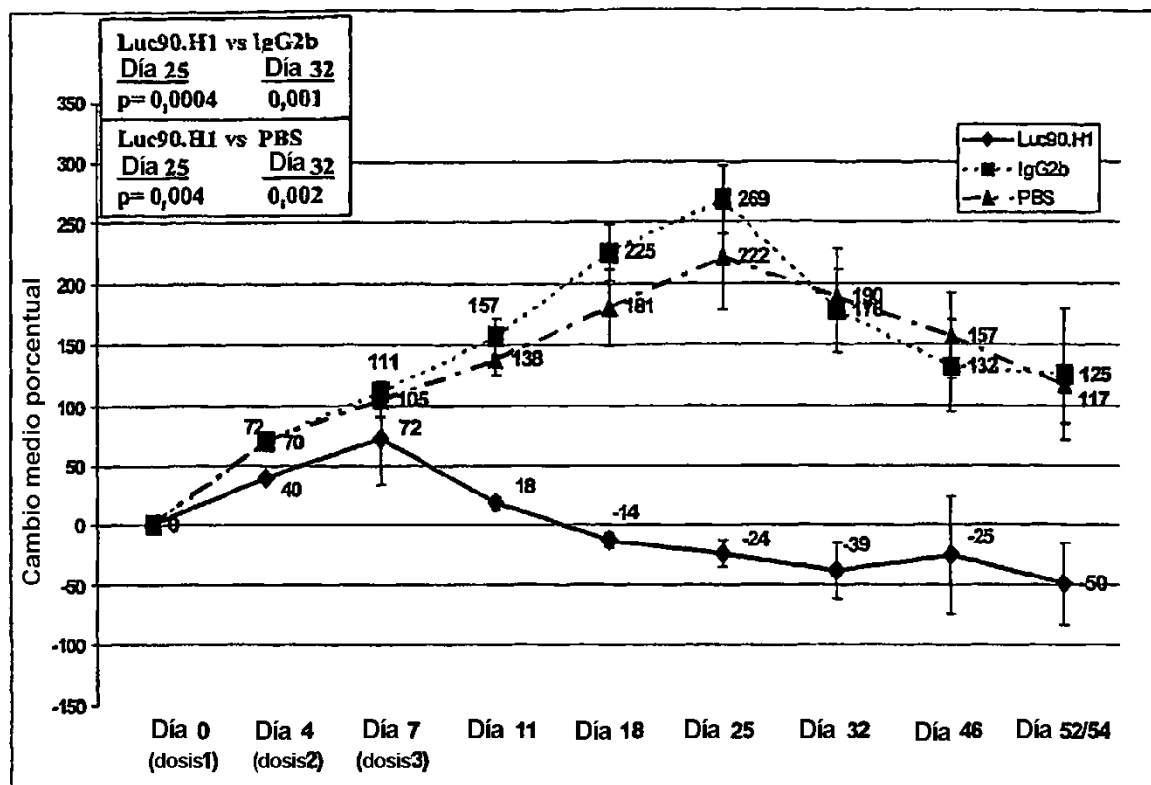


Figura 1A

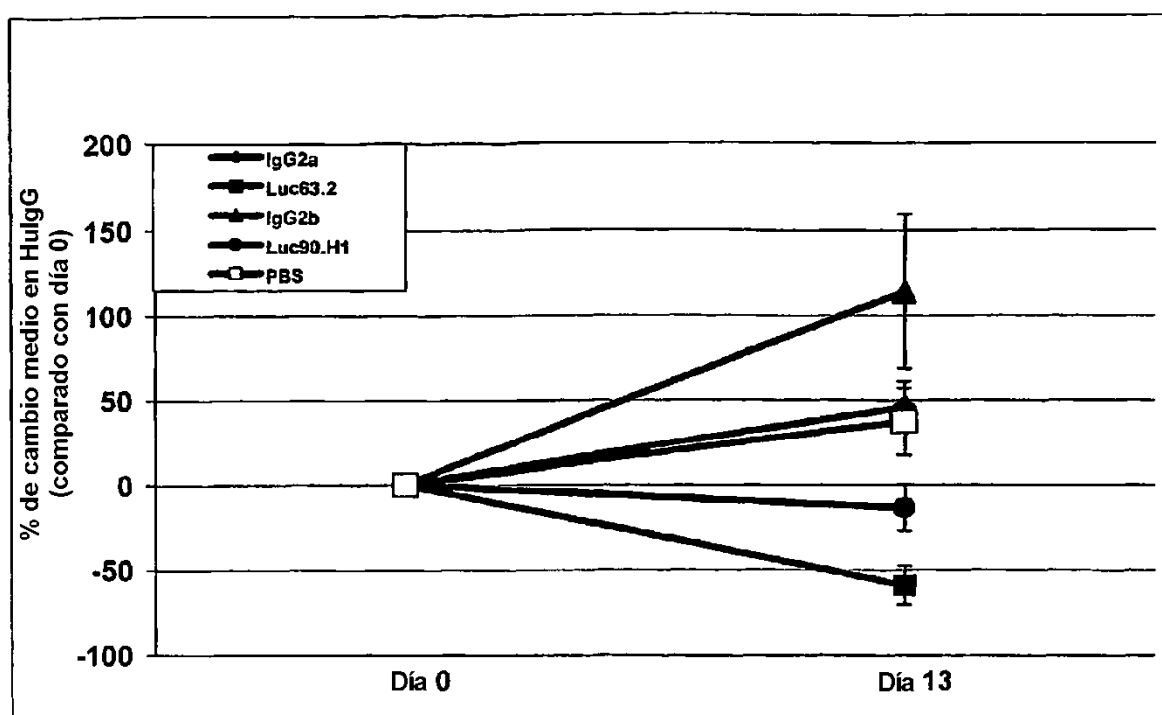


Figura 1B

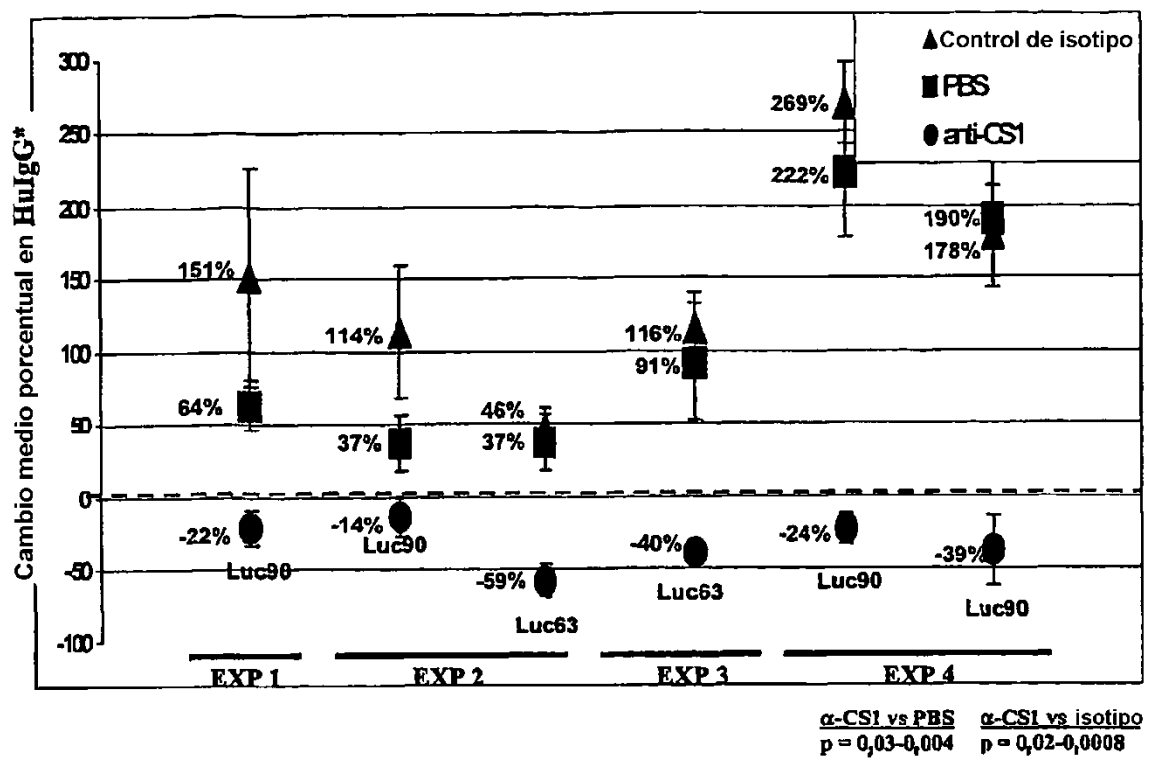


Figura 1C

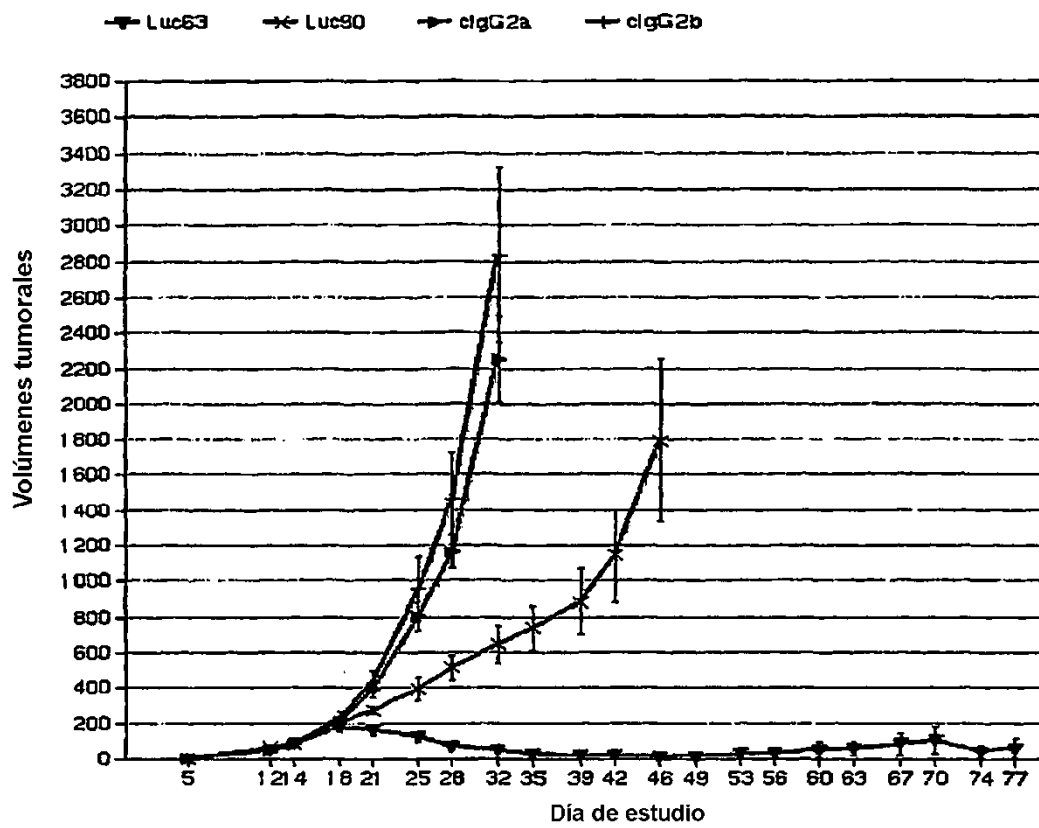
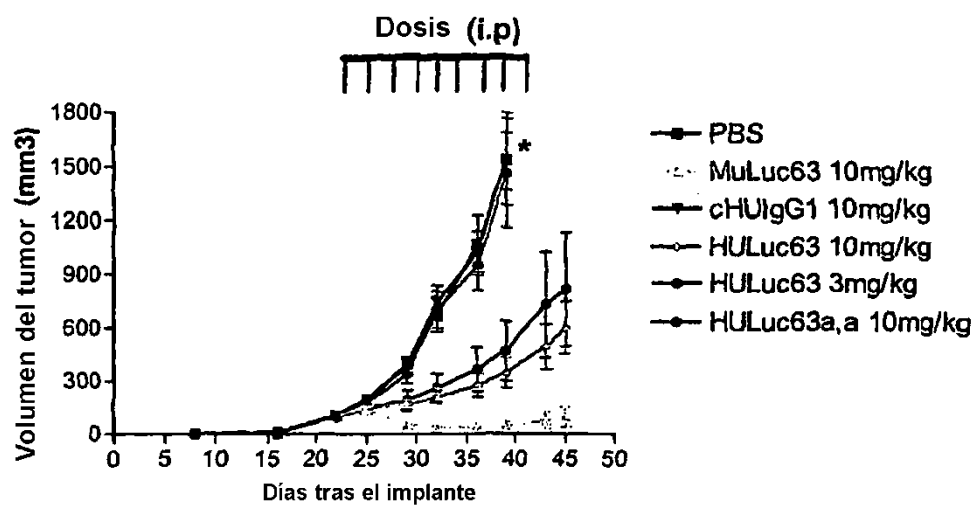


Figura 2



* Hubo de retirarse a los animales del estudio antes de la dosis final debido al tamaño del tumor

Figura 3