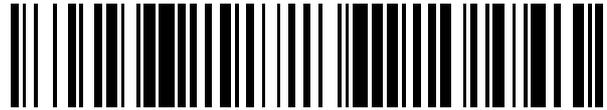


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 405 618**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.08.2006 E 06783136 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.03.2013 EP 2044123**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales dirigidos a tumores para FZD10 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

21.06.2006 US 815257 P

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

31.05.2013

73 Titular/es:

**ONCOTHERAPY SCIENCE, INC. (100.0%)
2-1, SAKADO 3-CHOME, TAKATSU-KU
KAWASAKI-SHI, KANAGAWA 213-0012, JP**

72 Inventor/es:

**NAKAMURA, YUSUKE;
KATAGIRI, TOYOMASA;
NAKATSURU, SHUICHI;
ENDO, KEIGO;
KUHARA, MOTOKI y
YAGI, KASUMI**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 405 618 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

Anticuerpos monoclonales dirigidos a tumores para FZD10 y usos de los mismos

Campo de la invención

5 La presente invención se relaciona con un anticuerpo o un fragmento del mismo que es capaz de unirse a la proteína de homólogo Frizzled 10 (FZD10), tal como un anticuerpo monoclonal de ratón, un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. También, la presente invención se relaciona con un método para tratar y/o evitar la enfermedad asociada con FZD10; un método para el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad asociada con FZD10; y un método para formación de imágenes in vivo de FZD10 en un sujeto.

Antecedentes de la invención

10 Se ha probado que los anticuerpos monoclonales contra moléculas específicas de cáncer son útiles en el tratamiento de cáncer (Harris, M (2004). *Lancet Oncol*, 5, 292-302.). Además de los ejemplos exitosos de aplicación clínica de los anticuerpos quiméricos o humanizados tal como trastuzumab (Baselga, J. (2004). *Oncology*, 61, Suppl 2 14-21.), rituximab (Maloney, D.G, et al. (1997). *Blood*, 90, 2188-95.) y bevacizumab (Ferrara, N., et al. (2004). *Nat Rev Drug Discov*, 3, 391-400.) para cáncer de mama, linfoma maligno y cáncer de colon, una serie de anticuerpos monoclonales contra otros objetivos moleculares están en desarrollo y se evalúan sus actividades anti-neoplásicas. Se espera que estos anticuerpos monoclonales proporcionen una esperanza a pacientes que tienen tumores que no tienen tratamiento efectivo. Uno de los asunto más importantes para estos anticuerpos monoclonales es el logro de efectos terapéuticos selectivos a células neoplásicas sin toxicidad severa debido a su reacción específica a células que expresan moléculas objetivo (Crist, W.M., et al. (2001). *J Clin Oncol*, 19, 3091-102.; Wunder, J.S., et al. (1998). *J Bone Joint Surg Am*, 80, 1020-33.; Ferguson, W.S. y Goorin, A.M. (2001). *Cancer Invest*, 19, 292-315.).

25 Entre los sarcomas de tejido blando, osteosarcoma, sarcoma de Ewing y rhabdomyosarcoma son sensibles a quimioterapia y estas enfermedades se pueden manejar bien por quimioterapia. De otra parte, sarcomas de células fusiformes son resistentes a quimio- y radioterapia y pacientes que usualmente exhiben pobre pronóstico. Para el sarcoma sinovial (SS), el tratamiento quirúrgico es efectivo para pacientes en una etapa temprana, pero no está disponible el fármaco terapéutico efectivo en aquellos en una etapa avanzada. Por lo tanto, se espera el desarrollo de modalidades terapéuticas novedosas para mejorar el pronóstico del paciente.

30 El análisis de expresión de en amplio de genoma en tumores proporciona la información útil para identificar los nuevos objetivos moleculares para el desarrollo de fármacos antineoplásicos novedosos y marcadores de tumor. En estudio previo, los presentes inventores han analizado el perfil de expresión de gen de diversos sarcomas de tejido humano utilizando microdisposición de cADN amplio de genoma que consiste de 23,040 genes y demuestra que el homólogo Frizzled 10 (FZD10) (Nos. de Acceso GenBank AB027464 (SEQ ID NO:1) y BAA84093 (SEQ ID NO:2)) se regula por aumento específicamente y frecuentemente en SS (Nagayama, S., et al. (2002) *Cancer Res*, 62, 5859-66.; y WO2004/020668). El producto de gen FZD10 es un miembro de la familia Frizzled y un receptor de señal WNT putativo (Koike, J., et al. (1999). *Biochem Biophys Res Commun*, 262, 39-43.). El análisis adicional muestra que el FZD10 se expresa específicamente en SS, y no en o nivel fuertemente detectable en otros órganos normales excepto la placenta, lo que sugiere que los agentes terapéuticos dirigen esta molécula no provocarían o poca reacción adversa (Nagayama, S., et al. (2002). *Cancer Res*, 62, 5859-66.). Los experimentos ARNi implican que el FZD 10 está involucrado significativamente en el crecimiento de tumor de SS (WO2006/013733). Adicionalmente, los presentes inventores generan el anticuerpo policlonal de conejo contra el dominio extracelular de FZD10 (FZD10-ECD), y encuentra que este anticuerpo tiene actividad antineoplásica en modelo de xenoinjerto de ratón de SS (Nagayama, S., et al. (2005). *Oncogene*, 24, 6201-12.; y WO2005/004912). En conjunto, se puede esperar que el anticuerpo terapia contra FZD10 mejore el resultado clínico de SS.

Resumen de la invención

45 Adelante se reporta que la generación de anticuerpos monoclonales de murino contra FZD10 por medio de método de inmunización de célula para posible aplicación clínica, actividad de unión a tumor in vivo de estos anticuerpos se evalúa utilizando el sistema de formación de imágenes fluorescente in vivo con fluorescencia casi infrarroja además del método convencional con radionúclidos. Aquí, revelamos la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales anti-FZD10 in vitro e in vivo así como también la internalización de estos anticuerpos en las células que expresan FZD10, y se encuentra que ratones de xenoinjerto que llevan SYO-1 tratados con la vena de la cola única de marcado con anti-FZD⁹⁰Y 10 Mab en dosis 100 mCi se observa efecto antineoplásico significativo.

Con base en los hallazgos anteriores, los presentes inventores concluyeron que los anticuerpos monoclonales de murino contra FZD 10 tienen potencial terapéutico en el tratamiento y diagnóstico de SS y otros tumores que sobreexpresan FZD10.

5 Por lo tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo quimérico o humanizado o fragmento del mismo que se une a la proteína FZD10 y en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) son las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 (FERM BP-10628).

En una realización, el anticuerpo o fragmento del mismo se selecciona del grupo que consiste de un anticuerpo de ratón, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, un fragmento de anticuerpo, y anticuerpo de cadena sencilla.

10 En una realización preferida, el anticuerpo es un anticuerpo de ratón. Preferiblemente, el anticuerpo de ratón comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 50 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 60. Por ejemplo, el anticuerpo de ratón se puede producir por el clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628).

En una realización preferida alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico.

15 Más preferiblemente, el anticuerpo quimérico comprende una región V de cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y una región V de cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 21. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 46 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 48.

20 En una realización, el anticuerpo quimérico comprende adicionalmente una región de anticuerpo C humana (constante).

En una realización preferida alternativamente, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. En una realización, el anticuerpo humanizado comprende adicionalmente una región de anticuerpo FR humana (estructura principal) y/o una región C de anticuerpo humano.

25 En todavía una realización alternativa, el anticuerpo o fragmento del mismo se puede marcar con una marca de radioisótopo o un marca fluorescente. Dicha marca de radioisótopo incluye ⁹⁰itrio (⁹⁰Y), ¹²⁵yodo (¹²⁵I) y ¹¹¹indio (¹¹¹In).

La presente invención proporciona adicionalmente un clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628) que produce el anticuerpo monoclonal de ratón 92-13.

30 La invención proporciona adicionalmente un anticuerpo o fragmento de acuerdo con la invención para uso en un método para tratar o evitar una enfermedad que se asocia con el homólogo Frizzled 10 (FZD10) en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un conjugado de dicho anticuerpo o fragmento con un fármaco antineoplásico o radionucleótido, en donde la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

35 La presente invención proporciona adicionalmente un método para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que se asocia con el homólogo Frizzled 10 (FZD10) o de una predisposición de desarrollar la enfermedad en un sujeto, que comprende

(a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con el anticuerpo o fragmento anterior;

(b) detectar la proteína FZD10 en la muestra o espécimen; y

40 (c) juzgar si o no el sujeto sufre de o está en riesgo de desarrollar la enfermedad con base en la abundancia relativa de la proteína FZD10 comparado con un control, en donde la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

45 La presente invención proporciona adicionalmente un anticuerpo de acuerdo con la invención que se marca con una marca de radioisótopo o una marca fluorescente para uso en un método para formación de imágenes in vivo de la proteína de homólogo Frizzled 10 (FZD10) en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicho anticuerpo.

5 La presente invención proporciona adicionalmente una composición farmacéutica para tratar o evitar una enfermedad asociada con el homólogo Frizzled 10 (FZD10), que comprende un conjugado del anticuerpo o fragmento anterior con un fármaco antineoplásico o radionucleótido y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en donde la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

La presente invención proporciona adicionalmente un equipo para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada con el homólogo Frizzled 10 (FZD10), que comprende el anticuerpo o fragmento anterior, la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

10 La invención proporciona adicionalmente un método para producir un anticuerpo quimérico contra FZD10 que comprende:

(a) aislar mRNA del clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628);

(b) sintetizar el cADN de región V de cadena pesada y ligera del mRNA aislado utilizando una transcriptasa inversa;

(c) amplificar dicho cADN utilizando PCR;

15 (d) ligar el ADN de región V amplificada y el ADN que codifica una región C humana para producir un vector de expresión;

(e) introducir el vector de expresión dentro de un anfitrión para producir el anticuerpo quimérico.

La invención proporciona adicionalmente un método para producir un anticuerpo humanizado contra FZD10 que comprende:

20 (a) diseñar una secuencia de ADN en el que los CDR del anticuerpo de ratón derivados del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 (FERM BP-10628) se ligan a las regiones de estructura principal humanas (FR);

(b) sintetizar dicha secuencia de ADN mediante un método PCR utilizando cebadores que tienen regiones superpuestas las regiones terminales de las CDR y FR;

(c) ligar el ADN sintetizado resultante al ADN que codifica una región C de anticuerpo humano;

25 (d) integrar el producto de ligado dentro un vector de expresión; y

(e) introducir dicho vector de expresión dentro de un anfitrión y producir por lo tanto el anticuerpo humanizado.

El término "enfermedad que se asocia con FZD10" (enfermedad asociada a FZD10) se refiere a una enfermedad que se asocia con la sobreexpresión de la proteína FZD10. Dichas enfermedades se limitan a, sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

30 El término "fragmento" significa cualquier fragmento de anticuerpo que se puede preparar del anticuerpo contra la proteína FZD10 y contiene las CDR definidas. Dicho fragmento incluye, pero no se limita a, fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, y fragmento Fv.

El término "anticuerpo modificado" significa cualquier anticuerpo que se puede derivar del anticuerpo contra FZD10 y contiene las CDR definidas. Dicho anticuerpo modificado incluye, pero no se limita a, un anticuerpo modificado PEG.

35 El fragmento de anticuerpo o fragmento modificado se puede reconocer fácilmente por una persona experta en la técnica y producido al utilizar cualesquier métodos conocidos en la técnica.

El término "sujeto" se refiere aquí a un sujeto que sufre de la enfermedad asociada con FZD10 y también un sujeto que sospecha tiene la enfermedad asociada con FZD10. El sujeto en la presente invención puede ser animales que incluyen mamíferos y animales aviares. Por ejemplo, los mamíferos pueden incluir humanos, ratones, ratas, monos, conejos, y perros.

40

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1a a 1f muestran la caracterización de especificidad de unión para dos anticuerpos monoclonales anti-FZD10.

5 La Figura 1a muestra análisis de citometría de flujo de los cuatro anticuerpos, 39-2 y 39-10 (descrito en el documento WO2005/004912), 92-13 y 93-22, utilizando cinco estirpes SS (SYO-1, YaFuSS, HS-SY-2, Fuji y 1973/99) y una estirpe celular de cáncer de colon (LoVo). Las líneas sólidas muestran la intensidad de fluorescencia detectada mediante cada mAbs; líneas discontinuas describen las intensidades de fluorescencia de las células incubadas con IgG de ratón no inmunizado como un control negativo.

10 La Figura 1b muestra RT-PCR semi-cuantitativo de FZD10 en las mismas estirpes de célula neoplásica como se utiliza en la Figura 1a. La expresión del gen de β 2-microglobulina (β 2MG) sirve como un control interno.

15 La Figura 1c muestra análisis de citometría de flujo de 92-13 (paneles superiores) y se indican 93-22 (paneles inferiores) contra FZD10 exógeno. La estirpe celular de cáncer de colon, SNU-C5 se transfecta con el vector vacío pCAGGS (paneles izquierdos) o pCAGGSFZD10- myc/His (paneles derechos) y se analiza 48 horas después de transfección. Las líneas sólidas muestran la intensidad de fluorescencia detectada mediante cada mAbs; las líneas discontinuas describen las intensidades de fluorescencia de las células incubadas con IgG de ratón no inmunizado como un control negativo.

La Figura 1d muestra la unión de 39-10, 39-2, 92-13 y 93-22 marcado 125 I para glóbulos rojos humanos normales. Los Mabs radiomarcados se incuban con cada sangre fresca humana normal de tres individuos (A, B y C) en la ausencia (barra abierta) o presencia (barra cerrada) de anticuerpos idénticos no marcados.

20 La Figura 1e muestra la actividad de unión de los Mabs marcados 125 I. Una cantidad constante de Mabs radiomarcados se incuban con célula SYO-1 y una cantidad creciente de anticuerpos no marcados. El porcentaje de radioactividad vinculado a las células se grafica contra la cantidad de anticuerpo no marcado. Círculo cerrado; 92-13, Círculo abierto; 93-22.

25 La Figura 1f muestra análisis de citometría de flujo de autobloqueo y bloque cruzado. Se incuban Alexa-488 marcado 92-13 (Paneles superiores) y 93-22 (Paneles inferiores) con célula SYO-1 en (i) PBS, o en la presencia de 100 mg de (ii) 92-13 no marcado y (iii) 93-22 no marcado. El histograma sombreado muestra la intensidad de fluorescencia detectada mediante cada Mab marcado con Alexa488; las líneas discontinuas describen las intensidades de fluorescencia de las células incubadas con PBS como un control negativo.

30 La Figura 2 muestra el análisis inmunohistoquímico en secciones de tejido congelado humano normal y SS sin anticuerpo (a, d, g, j, y m), 92-13 (b, e, h, k, y n) y 93-22 (c, f, i, l, y o). (a-c), sarcoma sinovial; (d-f), riñón; (g-i), hígado; (j- l), corazón; (m-o), cerebro. Magnificación original: x100.

35 La Figura 3 muestra la biodistribución de anticuerpos marcados 111 In y marcados 125 I. Se inyectan intravenosamente 10kBq de (a), anticuerpos marcados 111 In 92-13, (b), marcados 125 I92-13, (c), marcados 111 In 93-22 y (d), marcados 125 I 93-22 en ratones sin pelo BALB/c que llevan tumor SYO-1. Los órganos y el tumor se cortan en una hora (barra abierta), 24 horas (barra sombreada) y 48 horas (barra cerrada), y se miden las radioactividades. Los datos mostrados en los datos representativos en dos experimentos independientes.

40 La Figura 4a muestra la formación de imágenes de fluorescencia in vivo de ratones que llevan tumor SYO-1 después de la inyección de Alexa 647 marcados 92-13 o 93-22. Los Mab marcados con fluorescencia se administran en una dosis de 20 mg por ratón intraperitonealmente. Se adquieren todas las imágenes de fluorescencia con un tiempo de exposición de 60 segundos (f/detención = 2) antes de inyección, inmediatamente después de inyección (0 hora), 24, 48 y 96 horas. Las flechas indican la posición del tumor. El tumor S.C. se indica en la parte dorsal para 92-13 (paneles superiores) y en tronco para 93-22 (paneles inferiores). La señal de fluorescencia de Alexa647 es pseudo-coloreado de acuerdo con la barra de color indicada en la derecha. En 93-22 (panel inferior), las puntas de las flechas indican la posición de inyección.

45 La Figura 4b y 4c muestran imágenes representativas de órganos y tumores cortados de ratones mostrados en la Figura 4a, 4b; 92-13, y 4c; 93-22. i, SYO-1 tumor; ii, hígado; iii, bazo; iv, riñón; v, páncreas; vi, colon.

50 La Figura 5a muestra la formación de imágenes en fluorescencia in vivo de ratones que llevan tumor LoVo después de inyección de Alexa647 marcados 92-13 o 93-22. Los Mab marcados por fluorescencia se administran como la Figura 4. Todas las imágenes de fluorescencia se adquieren con un tiempo de exposición de 60 segundos (f/detención = 2) inmediatamente después de inyección (0 hora), 48, 72, 96 y 120 horas (h). La flecha indica la

posición del tumor. El tumor S.c. se ubica en pata delantera derecha para 92-13 (Paneles superiores) y 93-22 (paneles inferiores).

La Figura 5b y 5c muestran imágenes representativas de órganos y tumores cortados de ratones mostrado en la Figura 5a. 5b; 92-13 y 5c; 93-22. i, tumor LoVo; ii, hígado; iii, bazo; iv, riñón; v, páncreas; vi, colon.

5 La Figura 6 muestra la internalización de 92-13 y 93-22 se evalúa mediante microscopía confocal. Las células se tratan con PBS (a, d, y g), 50 mg/ml de 92-13 (b, e, y h) o 93-22 (c, f, i) durante 3 horas en 37° C, 5 % de CO₂. Los anticuerpos que se unen a la superficie celular se separan con ácido con 0.1M de regulador de glicina (pH 2.5). Las células se fijan, se permeabilizan y luego se bloquean con 3% de BSA. Se detectan anticuerpos intracelulares con IgG-Alexa488 anti-ratón de cabra y el núcleo se tiñe con DAPI. (a - c), SYO-1; (d - f), YaFuSS; (g - i) Lovo.

10 La Figura 7 muestra el efecto de ⁹⁰Y marcados 92-13 en crecimiento de tumor. Cuando los tumores se establecen (0.4-2.7 cm³), se les da en la vena de la cola única 100 mCi de ⁹⁰Y marcados 92-13.

La Figura 8 muestra ADCC quimérico inducido por 92-13 y 93-22 específicamente a las células SYO-1 que sobreexpresan FZD10. 1 mg/ml de anticuerpo quimérico 93-22 (ch93-22) o anticuerpo quimérico 92-13 (ch92-13) en diversas relaciones de Efecto:Objetivo. El PBMC de diversos donantes se utilizan como la célula Efectora; (a), (c) ADCC de 92-13 quimérico contra célula SYO-1 con cinco donantes PBMC saludables humanos; (b), (d) ADCC del 93-22 quimérico contra células LoVo con dos donantes PBMC humanos saludables. La cuantificación de citotoxicidad con actividad LDH se describe en (Nagayama, S., et al. *Oncogene*, 24, 6201-12.).

DESCRIPCIÓN DETALLADA Y REALIZACIONES PREFERIDAS DE LA PRESENTE INVENCIÓN

20 El homólogo Frizzled 10 (FZD10) es un miembro de la familia Frizzled, que es un receptor de señalización Wnt. Como se describe aquí adelante, establecemos exitosamente los anticuerpos monoclonales de murino y los anticuerpos quiméricos contra la proteína FZD10 que puede ser útil para uso médico.

25 Los anticuerpos específicos de FZD10 monoclonales de murino (92-13 y 93-22 Mabs) se establecen al inmunizar ratones con células transfectadas FZD10. Solo el anticuerpo 92-13 y los anticuerpos quiméricos o humanizados o fragmentos de los mismos las CDR del anticuerpo 92-13 están abarcados por la presente invención. El anticuerpo 93-22 se incluye solo para propósitos comparativos. Se muestra que los Mab 92-13 y 93-22 tienen actividad de unión específica contra FZD10 en la estirpe celular SS, células SYO-1 y células COS7 transfectadas con FZD10 al utilizar análisis de citometría de flujo (FACS). Para validar la actividad de unión específica de aquellos anticuerpos in vivo, los presentes inventores inyectan marcadores fluorescentes Mab intraperitonealmente o intravenosamente en los ratones que llevan xenoinjertos SS y se encuentra que estos Mab se unen a los tumores que expresan FZD10, pero no a cualesquiera otros tejidos de ratón normales mediante el uso del sistema de formación de imágenes fluorescentes in vivo y radioactividades. El análisis inmunohistoquímico posterior con los Mab confirma una ausencia o nivel fuertemente detectable de la proteína FZD10 en órganos humanos normales excepto la placenta. Adicionalmente, de forma interesante los presentes inventores encuentran que los Mab se internalizan en la estirpe celular SS, SYO-1, pero no en la estirpe celular negativa FZD10, LoVo utilizando microscopía de exploración láser confocal. De forma sorprendente, los ratones de xenoinjerto que llevan SYO-1 tratados con la vena de la cola única del anti-FZD10 marcado con Mab ⁹⁰Y (92-13) de una dosis 100mCi se observa efecto antineoplásico significativo. Tomados juntos, concluimos que estos Mab específicos contra FZD10 se pueden utilizar como el marcador diagnóstico novedoso o tratamiento de SS con mínimo o sin riesgo de reacciones adversas.

40 Debido a su estructura de proteína complicada, es frecuentemente difícil generar anticuerpos contra siete proteínas de transmembrana. En estudio previo, los presentes inventores demuestran que el FZD10 forma homo-oligómero (Nagayama, S., et al. (2005). *Oncogene*, 24, 6201-12.). Después de la falla de múltiples intentos para generar anticuerpos monoclonales anti-FZD10 que pueden reconocer una forma natural de FZD 10 mediante el uso de proteínas FZD10 de longitud completa o recombinante parcial, aplicamos finalmente inmunización mediante inyección de células COS-7 vivas que expresan FZD10 en la almohadilla de la pata de ratones Balb/c y obtienen exitosamente los dos hibridomas que producen anticuerpos anti-FZD10 que tienen la capacidad de reconocer la forma FZD10 natural en células vivas mediante análisis FACS. Debido a que aquellos anticuerpos no detectan la proteína FZD10 en western blott, los presentes inventores asumen que aquellos Mab reconocen la estructura terciaria de FZD10.

50 Para investigar la distribución in vivo de los Mab 92-13 y 93-22, los presentes inventores aplican dos métodos; uno con base en las modalidades radionúclido utilizando anticuerpos marcados ¹²⁵I y ¹¹¹In, y el otro con base en la formación de imágenes por fluorescencia utilizando anticuerpos marcados casi infrarrojos (Alexa647). El tinte casi infrarrojo, en su mayoría indocianuro, ahora se utiliza ampliamente en la formación de imágenes in vivo para propósitos diagnósticos debido a que la luz de esta longitud de onda penetra el tejido vivo muy eficientemente (Chen, X., et al. (2004). *Cancer Res*, 64, 8009-14.). Los resultados obtenidos de los dos métodos son muy concordantes e indican que 92-13 y 93-22 se une a células neoplásicas SYO-1, pero no a otros tejidos normales.

Para confirmar si se pueden aplicar aquellos anticuerpos para uso clínico, los presentes inventores examinan adicionalmente la actividad de unión de los anticuerpos contra los glóbulos normales. La actividad de unión de marcadores ¹²⁵I 92-13 y 93-22 contra glóbulos rojos humanos normales es indetectable en todos los tres donantes individuales (Figura 1d). Estos resultados son consistentes con aquellos de análisis FACS utilizando células mononucleares de sangre periférica humana (datos no mostrados), lo que sugiere aplicabilidad clínicas de estos dos anticuerpos con poca posibilidad de efecto adverso a pacientes SS debido a afinidad de unión muy específica para la molécula FZD10. Adicionalmente, los experimentos in vitro utilizando microscopía confocal revelan que la unión de Mab 92-13 y 93-22 específicos al FZD10 de superficie celular induce la internalización de los anticuerpos (Figura 6). Como se describió previamente (Stein, R., et al. (2001). *Crit Rev Oncol Hematol*, 39, 173-80.; Stein, R., et al. (2005). *Clin Cancer Res*, 11, 2727-34.), si los Mab marcados se internalizan después de unión, el anticuerpo marcado ¹²⁵I se metaboliza en las lisosomas y se difunde de células de tumor objetivo en donde el anticuerpo marcado ¹¹¹In permanece en las lisosomas. Como se observa en la Figura 3, las radioactividades del anticuerpo marcado ¹¹¹In y el anticuerpo marcado ¹²⁵I en tumores son significativamente diferentes (Figura 3, a y b, c y d). Estos hallazgos sugieren que los Mab 92-13 (y 93-22) se pueden internalizar específicamente en las células SS por medio de la proteína FZD10.

Cuando se aplican anticuerpos a la terapia de cáncer, los siguientes tres mecanismos se consideran que ejercen la actividad anti-neoplásica; (i) en el caso que la molécula objetivo está involucrada en mejora del crecimiento, la neutralización de anticuerpos bloquearía la transducción de señal de crecimiento y luego suprime el crecimiento de células neoplásicas; (ii) La segunda posibilidad es las actividades efectoras para inducir citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). (iii) El tercer caso es radionúclidos o fármaco antineoplásico que se conjuga aa anticuerpos y se suministra a las células neoplásicas objetivo efectivamente. Aunque los presentes inventores demuestran previamente que la molécula objetivo FZD10 está implicado en el crecimiento de tumor SS, ni los Mab 92-13 ni 93-22 muestran el efecto neutralizante in vitro cuando se agrega al medio de cultivo celular (datos no mostrados) o in vivo cuando se inyectan a ratones que tienen tumor (datos no mostrados).

Conjugar el radionúclido o fármaco antineoplásico con anticuerpos tal como Zevalin (anticuerpo anti-CD20 conjugado con ⁹⁰itrio) y Mylotarg (anticuerpo anti-CD33 conjugado con calicheamicina), se ha probado que es altamente efectivo para conferir citotoxicidad a los anticuerpos (Wiseman, GA. and Witzig, T.E. (2005). *Cancer Biother Radiopharm*, 20, 185-8.; van der Velden, V.H., et al. (2001). *Blood*, 97, 3197-204.; Carter, P. (2001). *Nat Rev Cancer*, 1, 118-29.). Mylotarg ejerce su actividad antineoplásica al liberar el fármaco antineoplásico, calicheamicina sin la célula de cáncer después que se internaliza (van der Velden, V.H., et al. (2001). *Blood*, 97, 3197-204.). En los Ejemplos, para experimentos terapéuticos, se genera el conjugado ⁹⁰itrio-DTPA-92-13 y se investiga su actividad antineoplásica. En el modelo de xenoinjerto de ratón, los tumores se disminuyen rápidamente después de tratamiento de ⁹⁰itrio-DTPA-92-13 (Figura 7). Notoriamente, los tumores que incluyen gran volumen (> 1cm³) de tumor no muestran refracción hasta 34 días después de administración y no se observa fuerte toxicidad. Debido a que los anticuerpos anti-FZD10 92-13 y 93-22 se internalizan efectivamente probablemente en células positivas de antígeno como se muestra en la Figura 6, la conjugación del fármaco antineoplásico a los Mab 92-13 y 93-22 también se espera que ejerza el alto efecto anti-cáncer para células SS. Con referencia a la actividad efectora, el 92-13 y 93-22 quimérico induce ADCC específicamente a las células SYO-1 que sobreexpresan FZD10 (Figura 8, a y c), pero no a las células LoVo negativas FZD10 (Figura 8, b y d). Particularmente, el 92-13 quimérico muestra mayor inducción de citotoxicidad cuando se compara con 93-22 quimérico, sin embargo, su actividad depende del donante de célula efectora, posiblemente provocada por polimorfismo del receptor Fc. En conclusión, los presentes inventores producen exitosamente anticuerpos monoclonales que son capaces de unirse específicamente a FZD10 en células neoplásicas que sobreexpresan FZD10 in vitro e In vivo. Juntos, los presentes inventores están seguros que los anticuerpos monoclonales anti-FZD10 tienen un gran potencial para el desarrollo de terapias de fármaco novedosas para el tratamiento de SS y otros tumores que sobre-expresan FZD70.

1. Producción de un anticuerpo

Los anticuerpos que se pueden utilizar en la presente invención reaccionan específicamente contra una proteína FZD10 derivada de una enfermedad asociada con FZD10. El término "anticuerpo" utilizado aquí significa una molécula de anticuerpo como un todo, o sus fragmentos tal como fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂ y fragmentos Fv, que se pueden unir a la proteína o sus péptidos parciales como el antígeno. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal. También puede ser un anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico, o un anticuerpo Fv de cadena sencilla (scFv). Los anticuerpos (anticuerpos policlonales y anticuerpos monoclonales) para uso en la presente invención se pueden preparar, por ejemplo, mediante el siguiente proceso.

(1) Anticuerpo Monoclonal

Inicialmente, se prepara un antígeno para la producción de un anticuerpo útil en la presente invención. La proteína FZD10 o su péptido parcial se puede utilizar como una proteína inmunogénica. Alternativamente, una célula que expresa la proteína FZD 10 o su péptido parcial también se pueden utilizar como un inmunógeno. La secuencia de

5 aminoácidos de la proteína FZD 10 utilizada como el inmunógeno en la presente invención y la secuencia de cADN que codifica la proteína están públicamente disponibles en GenBank como Nos. de Acceso BAA84093 (SEQ ID NO: 1) y AB027464 (SEQ ID NO: 2), respectivamente. La proteína FZD10 o su péptido parcial para uso como el inmunógeno se puede preparar sintéticamente de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica tal como un proceso de síntesis de péptido de fase sólida, utilizando la información de secuencia de aminoácidos disponible. Los péptidos parciales de la proteína FZD10 incluyen, pero no se limitan a, un péptido que contiene los residuos 1-225 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, que corresponde al dominio extracelular de terminal N de la proteína FZD10 (FZD10-ECD).

10 La proteína o su péptido parcial, o la célula que los expresa se puede preparar al utilizar la información de secuencia del cADN que codifica la proteína FZD10 o su péptido parcial de acuerdo con un procedimiento de recombinación de gen conocido. Se ilustrará adelante la producción de la proteína o su péptido parcial así como también la célula que los expresa de acuerdo con dicho procedimiento de recombinación de gen.

15 Un vector recombinante para la producción de la proteína se puede obtener al ligar la secuencia de cADN anterior en un vector apropiado. Se puede obtener un transformante al introducir el vector recombinante para la producción de proteína dentro de un anfitrión de tal manera que se puede expresar la proteína objetivo FZD10 o su péptido parcial.

20 Como el vector, se utiliza un fago o plásmido que es capaz de replicar autónomamente en un anfitrión. Ejemplos de un ADN de plásmido incluyen pCAGGS, pET28, pGEX4T, pUC118, pUC119, pUC18, pUC19, y otros ADN de plásmido derivados de Escherichia coli; pUB110, pTP5, y otros ADN de plásmido derivados de Bacillus subtilis; y YEp13, YEp24, YCp50 y otros ADN de plásmido derivados de levadura. Ejemplos de un ADN de fago incluyen fagos lambda tal como λgt11 y λZAP. Adicionalmente, los vectores de virus de animal tal como vector de retrovirus y vector del virus vaccinia se pueden utilizar, y también se pueden utilizar vectores de virus de insecto tal como el vector baculovirus.

25 El ADN que codifica la proteína FZD10 o su péptido parcial (de aquí en adelante denominado como ADN FZD10) se inserta dentro del vector, por ejemplo, mediante el siguiente método. En este método, el ADN purificado se divide mediante una enzima de restricción apropiada y se inserta dentro de un sitio de enzima de restricción o un sitio multiclonación de un ADN de vector apropiado para ligar dentro del vector.

30 Además de un promotor y el ADN FZD10, cualquiera de los mejoradores y otros elementos cis, señales de división, señales de poli adición A, marcadores selectivos, sitio de unión a ribosoma (RBS), y otros elementos se pueden ligar en el vector recombinante para la producción de proteína para uso en células de mamífero, si se desea.

Para ligar el fragmento de ADN al fragmento de vector, se puede utilizar una ligasa de ADN conocida. El fragmento de ADN y el fragmento de vector se hibridan y ligan, produciendo por lo tanto un vector recombinante para la producción de una proteína.

35 El anfitrión para uso en la transformación no se limita específicamente mientras que permite que la proteína FZD10 o su péptido parcial se exprese allí. Ejemplos del anfitrión incluyen bacterias, por ejemplo, E. coli, y Bacillus; levadura, por ejemplo, Saccharomyces cerevisiae; células de animal, por ejemplo, células COS, células de Ovario de Hámster Chino (CHO), y células de insecto.

40 Por ejemplo, cuando se utiliza una bacteria como el anfitrión, el vector recombinante para la producción de proteína debe ser preferiblemente capaz de replicar autónomamente en la bacteria anfitriona y comprender un promotor, un sitio de unión a ribosoma, el ADN FZD10, y una secuencia de terminación de transcripción. El vector recombinante puede comprender adicionalmente un gen para regular el promotor. Un ejemplo de Escherichia coli incluye Escherichia coli BRL, y un ejemplo de Bacillus es Bacillus subtilis. Se puede utilizar aquí cualquier promotor que se puede expresar en el anfitrión tal como Escherichia coli.

45 El vector recombinante se puede introducir dentro de la bacteria anfitriona mediante cualesquier procedimientos conocidos en la técnica. Dichos procedimientos incluyen, por ejemplo, un método que utilizan iones de calcio y una electroporación. Cuando la célula de levadura, una célula de animal, o una célula de insecto se utiliza como el anfitrión, se puede producir un transformante de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica, y luego se puede producir la proteína FZD10 o su péptido parcial en el anfitrión (transformante).

50 La proteína FZD10 o su péptido parcial para uso como el inmunógeno en la presente invención se pueden obtener de un cultivo del transformante generado anteriormente. El "cultivo" se refiere a cualquier sobrenadante de cultivo, células de cultivo, microorganismos de cultivo, y homogenatos de los mismos. El transformante se cultiva en un medio de cultivo mediante un proceso convencional para cultivar un anfitrión.

El medio de cultivo para cultivar el transformante obtenido al utilizar *Escherichia coli*, levadura, u otros microorganismos como el anfitrión puede ser un medio natural o un medio sintético, mientras que comprende una fuente de carbono, fuente de nitrógeno, sales inorgánicas, y otros componentes utilizables mediante el microorganismo y permite el transformante para crecer eficientemente.

5 El transformante se cultiva de manera general al agitar el cultivo o cultivo de aireación con agitación bajo condiciones aeróbicas de 25 °C a 37 °C durante 3 a 6 horas. Durante cultivo, el pH se mantiene a un nivel casi neutro mediante ajuste con, por ejemplo, un ácido orgánico o inorgánico, y una solución alcalina. Durante el cultivo, los antibióticos tal como ampicilina o tetraciclina se pueden agregar al medio de acuerdo con el marcador selectivo insertado dentro del vector recombinante de expresión, si es necesario.

10 Después de cultivo, cuando la proteína FZD10 o su péptido parcial se produce dentro del microorganismo o célula, la proteína o su péptido parcial se extrae al homogenizar el microorganismo o célula. Cuando la proteína FZD10 o su péptido parcial se secreta del microorganismo o célula, el medio de cultivo se utiliza como está, o se retiran los residuos del microorganismo o célula del medio de cultivo, por ejemplo, mediante centrifugación. Después de esto, la proteína FZD10 o su péptido parcial se pueden aislar del cultivo y se purifica mediante un método bioquímico
15 convencional para el aislamiento y purificación de las proteínas, tal como precipitación de sulfato de amonio, cromatografía de gel, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de afinidad, ya sea individualmente o en combinación.

Ya sea o no que se confirme que se ha obtenido la proteína FZD10 o su péptido parcial, por ejemplo, mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS.

20 Luego, la proteína FZD10 obtenida o su péptido parcial, o el transformante se disuelven en un regulador para preparar un inmunógeno. Cuando sea necesario, se puede agregar un adyuvante a este para inmunización efectiva. Dichos adyuvantes incluyen por ejemplo, adyuvante completo de Freund comercialmente disponible y adyuvante incompleto de Freund. Se pueden utilizar cualquiera de estos adyuvantes solos o en combinación.

25 El inmunógeno así preparado se administra a un mamífero tal como un conejo, rata, o ratón. La inmunización se realiza principalmente mediante inyección intravenosa, subcutánea, o intraperitoneal. El intervalo de inmunización no se limita específicamente y el mamífero se inmuniza una a 3 veces en intervalos que cambian de varios días a semanas. Las células que producen el anticuerpo se recolectan 1 a 7 días después de la última inmunización. Ejemplos de las células que producen el anticuerpo incluyen células de bazo, células de nodo linfático, y células de sangre periférica.

30 Para obtener un hibridoma, una célula que produce el anticuerpo y una célula de mieloma se fusionan. Cuando la célula de mieloma se fusiona con la célula que produce el anticuerpo, se puede utilizar una estirpe celular establecida generalmente disponible. Preferiblemente, la estirpe celular utilizada debe tener selectividad de fármaco y propiedades de tal manera que no sobrevive en un medio selectivo HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina) en forma no fusionada y puede sobrevivir solo cuando se fusiona con una célula que produce el anticuerpo.
35 Las posibles células de mieloma incluyen, por ejemplo, estirpes celulares de mieloma de ratón tal como P3X63-Ag.8.U1 (P3U1), y NS-I.

Luego, la célula de mieloma y la célula que produce el anticuerpo se fusionan. Para la fusión, estas células se mezclan, preferiblemente en la relación de la célula que produce el anticuerpo a la célula de mieloma de 5: 1, en un medio de cultivo para células de animal que no contiene suero, tal como medio DMEM y RPMI-1640, y se fusionan
40 en la presencia de un agente que promueve la fusión de la célula tal como polietilenglicol (PEG). La fusión de la célula también se puede llevar a cabo al utilizar un dispositivo de fusión celular comercialmente disponible utilizando electroporación.

Luego, se recoge el hibridoma de las células después de tratamiento de fusión anterior. Por ejemplo, se diluye apropiadamente una suspensión celular con, por ejemplo, el medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal y luego se pone en placa sobre una placa de microtítulo. Se agrega un medio selectivo a cada pozo, y las células se cultivan al reemplazar apropiadamente el medio selectivo. Como resultado, las células que crecen aproximadamente
45 30 días después del inicio del cultivo en el medio selectivo se pueden obtener como el hibridoma.

El sobrenadante de cultivo del hibridoma que crece luego se detecta para la presencia de un anticuerpo que reacciona con la proteína FZD10 o su péptido parcial. La detección del hibridoma se puede realizar de acuerdo con un procedimiento convencional, por ejemplo, utilizando ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA),
50 inmunoensayo de enzima (EIA) o radioinmunoensayo (RIA). Las células fusionadas se clonan mediante la dilución limitante para establecer un hibridoma, que produce el anticuerpo monoclonal de interés.

El anticuerpo monoclonal se puede recolecta del hibridoma establecido, por ejemplo, mediante un método de cultivo de células convencional o al producir ascitis. Si es necesario, el anticuerpo se puede purificar en el método de

recolección de anticuerpos descrito anteriormente de acuerdo con un procedimiento conocido tal como precipitación con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio de iones, filtración de gel, cromatografía de afinidad, o una combinación de los mismos.

5 El tipo globulina de los anticuerpos monoclonales útiles en la presente invención no se limita específicamente, mientras que son capaces de unirse específicamente a la proteína FZD10 y puede ser cualquiera de IgG, IgM, IgA, IgE, e IgD. Entre estos, se prefieren IgG e IgM.

10 En la presente invención, el anticuerpo monoclonal de murino 92-13 se establece exitosamente y se utiliza preferiblemente. El clon de hibridoma 93-22 que produce anticuerpo monoclonal de ratón 93-22 se deposita por Shuichi Nakatsuru internacionalmente en el IPOD International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-Ken, 305-8566 Japón) de Junio 14, 2006 bajo el número de depósito FERM BP-10620. También, el clon de hibridoma 92-13 que produce el anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 se deposita por Shuichi Nakatsuru internacionalmente en el Organismo de Patente Internacional IPOD Depositario del Instituto Nacional AIST de Junio 28, 2006 bajo el número de depósito de FERM BP-10628. El anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma se puede utilizar preferiblemente en la presente invención.

20 En la presente invención, también se puede utilizar un anticuerpo monoclonal tipo recombinante, que se puede producir al clonar un gen de anticuerpo del hibridoma, integrar el gen de anticuerpo dentro de un vector adecuado, introducir el vector dentro de un anfitrión, y producir el anticuerpo del anfitrión de acuerdo con una técnica de recombinación genética convencional (véase, por ejemplo, Vandamme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-75).

25 Más específicamente, mRNA que codifica la región variable (V) del anticuerpo monoclonal anti-FZD10 de ratón se aísla del hibridoma que produce el anticuerpo (por ejemplo, aquel descrito anteriormente). El aislamiento del mRNA se realiza al preparar un ARN total mediante cualquier método conocido, tal como método de ultracentrifugación de guanidinio (Chirgwin, J. M et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-9) y método AGPC (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-9), y luego producir el mRNA deseado del ARN total utilizando el Equipo de Purificación de mRNA (Pharmacia) o similares. Alternativamente, el mRNA también se puede preparar directamente utilizando el Equipo de Purificación de mRNA QuickPrep (Pharmacia).

30 Luego, el cDNA para la región V del anticuerpo se sintetiza a partir del mRNA con una transcriptasa inversa. La síntesis del cADN se puede realizar utilizando un equipo comercialmente disponible, por ejemplo, Equipo Gene Racer™. (Invitrogen). El cADN también se puede sintetizar o amplificar mediante el método 5'-RACE (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-32) utilizando Equipo FINDER RACE 5'-Ampli (Clontech) en combinación con un método PCR.

35 La secuencia de aminoácidos de cadena H y cadena L de anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 se muestran en la SEQ ID NO: 58 y 60, respectivamente (codificado por la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 57 y 57, respectivamente). La secuencia de aminoácidos de cadena H y cadena L de anticuerpo monoclonal de ratón 93-22 se muestra en la SEQ ID NO: 61 y 63, respectivamente (codificado por la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 62 y 64, respectivamente). Con base en la información de secuencia, los cebadores utilizados para amplificar la cadena H o cadena L del anticuerpo monoclonal de ratón de interés se puede diseñar utilizando un método convencional.

40 Se aísla un fragmento de ADN de interés y se purifica del producto PCR resultante y luego se liga a un vector de ADN para obtener un vector recombinante. El vector recombinante se introduce dentro de un anfitrión tal como E. coli, y se selecciona una colonia que contiene un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés en el vector recombinante se confirma utilizando, por ejemplo, un secuenciador automático.

45 Una vez se obtiene el ADN que codifica la región V del anticuerpo anti-FZD10, el ADN se integra dentro de un vector de expresión que contiene ADN que codifica la región constante de anticuerpo (C).

Para la producción del anticuerpo anti-FZD10 utilizado en la presente invención, el gen de anticuerpo se integra dentro de un vector de expresión de tal manera que el gen de anticuerpo se puede expresar bajo el control de los elementos de control de expresión (por ejemplo, mejorador, promotor). Una célula anfitriona se transforma con el vector de expresión para expresar el anticuerpo.

50 En la expresión del gen de anticuerpo, el ADN que codifica la cadena pesada (H) y ADN que codifica la cadena ligera (L) del anticuerpo se puede integrar dentro de vectores de expresión separados, y luego una célula anfitriona se co-transforma con los vectores recombinantes de expresión resultantes. Alternativamente, el ADN que codifica la cadena H y el ADN que codifica la cadena L del anticuerpo se puede integrar en un vector de expresión único, y

luego se transforma una célula anfitriona con el vector recombinante de expresión resultante (por ejemplo, documento WO 94/11523).

El gen de anticuerpo se puede expresar mediante métodos conocidos. Para la expresión en una célula de mamífero, un promotor convencional útil, el gen de anticuerpo que se va a expresar y se puede unir funcionalmente una señal poli(A) (ubicada en la dirección 3' hacia el extremo 3' del gen de anticuerpo). Por ejemplo, como el sistema de promotor/mejorador útil, se puede utilizar el sistema de promotor/mejorador temprano inmediato de citomegalovirus humano.

Otros sistemas de promotor/mejorador, por ejemplo, aquellos derivados de virus (por ejemplo, retrovirus, virus polioma, adenovirus y virus de simio 40 (SV40)) y aquellos derivados de células de mamífero (por ejemplo, factor 1 alfa de elongación humano (alfa HEF1)), también se puede utilizar para la expresión del anticuerpo en la presente invención.

Cuando se utiliza el sistema de promotor/mejorador SV40, la expresión del gen se puede realizar fácilmente por el método de Mulligan et al. (*Nature* (1979) 277, 108-14.). Cuando se utiliza el sistema de promotor/mejorador alfa HEF1, la expresión del gen se puede realizar fácilmente por el método de Mizushima et al. (*Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322.).

Para la expresión en *E. coli*, un promotor útil convencional, una secuencia de señal para secretar el anticuerpo de interés y el gen de anticuerpo se puede unir funcionalmente. Como el promotor, se puede utilizar el promotor lacZ o el promotor araB. Cuando se utiliza el promotor lacZ, la expresión del gen se puede realizar mediante el método de Ward et al. (*Nature* (1998) 341, 544-6.; *FASBE J.* (1992) 6, 2422-7.), mientras que cuando se utiliza el promotor araB, la expresión del gen se puede realizar mediante el método de Better et al. (*Science* (1988) 240, 1041-3.).

Con respecto a la secuencia de señal para secreción del anticuerpo, cuando el anticuerpo de interés pretende ser secretado en un espacio periplásmico de la secuencia de señal *E. coli*, se puede utilizar pelB (Lei, S.P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379-83.). El anticuerpo secretado en el espacio periplásmico se aísla y luego se vuelve a plegar de tal manera que el anticuerpo toma una configuración apropiada.

Se pueden utilizar derivados de virus de origen de replicación (por ejemplo, SV40, virus polioma, adenovirus, virus de papiloma bobino (BPV)) o similares. Con el fin de aumentar el número de copia de gen en el sistema de célula anfitriona, el vector de expresión puede contener adicionalmente un gen marcador selectivo, tal como un gen aminoglicosido fosfotransferasa (APH), un gen quinasa timidina (TK), un gen xantina-guanina *E. coli*, gen fosforibosiltransferasa (Ecogpt) y un gen reductasa dihidrofolato (dhfr).

Para la producción del anticuerpo utilizado en la presente invención, se puede utilizar cualquier sistema de expresión que incluye sistemas de células eucarióticas y procarióticas. La célula eucariótica incluye estirpes celulares establecidas de animales (por ejemplo, mamíferos, insectos, mohos y hongos, levadura). La célula procariótica incluye células bacterianas tal como células *E. coli*. Es preferible que el anticuerpo utilizado en la presente invención se exprese en una célula de mamífero, tal como una célula CHO, COS, mieloma, BHK, Vero y HeLa.

Luego, la célula anfitriona transformada se cultiva in vitro o in vivo para producir el anticuerpo de interés. El cultivo de la célula anfitriona se puede realizar mediante cualquier método conocido. El medio de cultivo que se puede utilizar aquí puede ser medio DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM. El medio de cultivo puede contener un complemento de suero, tal como suero de becerro fetal (FCS).

En la producción del anticuerpo recombinante, a pesar de las células anfitrionas mencionadas anteriormente, también se puede utilizar un animal transgénico como un anfitrión. Por ejemplo, el gen de anticuerpo se inserta dentro de un sitio predeterminado de un gen que codifica una proteína inherentemente producida en la leche de un animal (por ejemplo, beta-caseína) para preparar un gen de fusión. Un fragmento de ADN que contiene el gen de fusión introducido en el gen de anticuerpo se inyecta dentro de un embrión de un animal diferente al humano, y el embrión luego se introduce en un animal hembra. El animal hembra tiene el embrión allí que lleva un animal transgénico diferente a humano. El anticuerpo de interés se secreta en la leche del animal transgénico diferente a humano o una progenie del mismo. Para el propósito de aumentar la cantidad de la leche que contiene el anticuerpo, se puede administrar una hormona apropiada al animal transgénico (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702.).

El anticuerpo expresado y producido como se describió anteriormente se puede aislar de las células o el cuerpo del animal anfitrión y se purifica. El aislamiento y purificación del anticuerpo utilizado en la presente invención se puede realizar sobre una columna de afinidad. También se pueden utilizar otros métodos convencionalmente utilizados para el aislamiento y purificación de un anticuerpo; así el método no se limita particularmente. Por ejemplo, se pueden utilizar diversas cromatografías, filtración, ultrafiltración, precipitación salina y diálisis solas o en combinación

para aislar y purificar el anticuerpo de interés (Antibodies A Laboratory Manual. Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

(2) Anticuerpo quimérico y Anticuerpo humanizado

5 En la presente invención, se puede utilizar un anticuerpo recombinante modificado artificialmente, que incluye un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado. Estos anticuerpos modificados se pueden preparar mediante cualquier método conocido. Por ejemplo, se pueden utilizar técnicas desarrolladas para la producción de "Anticuerpos quiméricos" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-5.; Neuberger et al., 1984, Nature, 312: 604-8.; Takeda et al., 1985, Nature, 314: 452-4.). Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones se derivan de diferentes especies de animal, tal como aquellas que tienen una región variable derivada de un mAb de murino y una región constante de inmunoglobulina humana, por ejemplo, "anticuerpos humanizados".

10 Un anticuerpo quimérico de acuerdo con la presente invención se puede preparar al ligar el ADN que codifica la región V del anticuerpo al ADN que codifica una región C del anticuerpo humano, integrar el producto de ligado dentro de un vector de expresión, e introducir el vector recombinante de expresión resultante dentro de un anfitrión para producir el anticuerpo quimérico.

15 Un anticuerpo humanizado también se denomina como "anticuerpo humano reformado", en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero diferente a humano (por ejemplo, un ratón) se injertan de aquel de un anticuerpo humano. También se conoce el procedimiento de recombinación genética general para producir dicho anticuerpo humanizado (por ejemplo, documento EP 125023; WO 96/02576.).

20 Específicamente, se diseña una secuencia de ADN en la que los CDR del anticuerpo de ratón se ligan a través de regiones de estructura principal (FR), y se sintetiza mediante un método PCR utilizando diversos oligonucleótidos como cebadores que se diseñan por tener regiones que sobresalen a las regiones terminales de las CDR y FR. El ADN resultante se liga al ADN que codifica la región C de anticuerpo humano, y el producto de ligado se integra dentro de un vector de expresión. El vector recombinante de expresión resultante se introduce dentro de un anfitrión, produciendo por lo tanto el anticuerpo humanizado (por ejemplo, documento WO 96/02576.).

25 Los FR ligados a través de las CDR se seleccionan de tal manera que las CDR pueden formar un sitio de unión de antígeno funcional. Si es necesario, un aminoácido en FR de la región V del anticuerpo se puede reemplazar de tal manera que las CDR del anticuerpo humano reformado pueden crear un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-6.).

30 El anticuerpo quimérico está compuesto de regiones V derivadas de un anticuerpo de mamífero diferente a humano y regiones C derivadas de un anticuerpo de humano. El anticuerpo humanizado está compuesto de CDR derivadas de un anticuerpo de mamífero diferente a humano y FR y regiones C derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado puede ser útil para uso clínico, debido a que se reduce la antigenicidad del anticuerpo contra un cuerpo humano.

35 Un ejemplo específico de un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado utilizado en la presente invención es un anticuerpo en el que las CDR se derivan del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13. El método para producir dichos anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados se describe adelante.

40 Para clonar el ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región V del anticuerpo monoclonal de ratón anti-FZD10, el mRNA se puede aislar de hibridomas y cada cADN en las regiones V de las cadenas L y H se puede sintetizar con el uso de una transcriptasa inversa como se describió anteriormente. En la síntesis del cADN, se puede utilizar el cebador Oligo-dT u otro cebador apropiado que hibrida a la región C de cadena L o H. Por ejemplo, pero no se limita a, el cebador CH1 (IgG2a) que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 3 para la región V de cadena H y se puede utilizar el cebador CL1 (κ) que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEQ ID NO: 4 para la región V de cadena L.

45 Se puede realizar amplificación del cADN de cadenas L y H mediante PCR (reacción de cadena polimerasa) utilizando un equipo comercialmente disponible (por ejemplo, equipo GeneRacer™ de Invitrogen) o utilizando un método conocido que incluye el método 5'-RACE (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988.; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res., 17, 2919-32, 1989.).

50 Los cebadores específicos para amplificar el ADN para las regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 incluyen cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NOs: 5 y 6 la región V de cadena H y cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NOs: 7 y 8 para la región V de cadena L. Utilizando estos cebadores, un ADN que codifica la región V de cadena H tienen una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 13 y se puede amplificar un ADN que codifica la región V de cadena L que tienen secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 21. Los cebadores específicos

5 para amplificar ADN para las regiones V del anticuerpo monoclonal de ratón 93-22 incluyen cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NOS: 53 y 54 para la región V de cadena H y cebadores que tienen las secuencias de nucleótidos mostradas en la SEQ ID NOS: 55 y 56 para la región V de cadena L. Utilizando estos cebadores, un ADN que codifica la región V de cadena H que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 29 y se puede amplificar un ADN que codifica la región V de cadena L que tiene una secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEQ ID NO: 37.

Luego, los productos amplificados se someten a electroforesis en gel de agarosa de acuerdo con procedimientos convencionales, y los fragmentos de ADN de interés se cortan, se recuperan, se purifican y ligan a un ADN de vector.

10 El ADN obtenido y el ADN de vector se pueden ligar utilizando un equipo de ligación conocido para construir un vector recombinante. Se puede preparar un ADN de vector en un método conocido: J. Sambrook, et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. El ADN del vector se digiere con enzimas de restricción, y la secuencia de nucleótidos de un ADN deseado se puede determinar mediante un método conocido o utilizando un secuenciador automático.

15 Una vez los fragmentos de ADN que codifican las regiones V de cadena L y H del anticuerpo monoclonal de ratón (aquí adelante cadena L o H de un anticuerpo algunas veces se puede denominar como "cadena L o H de ratón" para anticuerpos de ratón y "cadena L o H humano" para anticuerpos humanos) se clonan, los ADN que codifican las regiones V de ratón y los ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpo humanas se ligan y se expresan para producir los anticuerpos quiméricos.

20 Un método estándar para preparar anticuerpos quiméricos implica ligar una secuencia líder de ratón y la secuencia de región V presente en un cADN clonado a una secuencia que codifica la región C de anticuerpo humano ya presente en un vector de expresión de una célula de mamífero. Alternativamente, una secuencia líder de ratón y secuencia de región V presente en un cADN clonado se ligan en una secuencia que codifica una región C de anticuerpo humano seguido por ligación a un vector de expresión de célula de mamífero.

25 El polipéptido que comprende la región C de anticuerpo humano puede ser cualquiera de las regiones C de cadena H o cadena L de anticuerpos humanos, que incluyen, por ejemplo, C gamma 1, C gamma 2, C gamma 3 o C gamma 4 para cadenas H humanas o C lambda o C kappa para cadenas L.

30 Para preparar un anticuerpo quimérico, se construyen dos vectores de expresión primer; es decir, un vector de expresión que contiene ADN que codifica la región V de cadena L humana y la región C de cadena L humana C bajo el control de un elemento de control de expresión tal como un sistema mejorador/promotor, y se construye un vector de expresión que contiene los ADN que codifican la región V de cadena H de ratón y una región C de cadena H humana bajo el control de un elemento de control de expresión tal como un sistema mejorador/ promotor. Luego, las células anfitrionas tal como células de mamífero (por ejemplo, célula COS) se cotransforman con estos vectores de expresión y las células transformadas se cultivan in vitro o in vivo para producir un anticuerpo quimérico: véase, por ejemplo, documento WO91/16928.

40 Alternativamente, la secuencia líder de ratón presente en el cADN clonados y los ADN que codifican la región V de cadena L de ratón y la región D de cadena L humana así como también la secuencia líder de ratón y los ADN que codifican la región V de cadena H de ratón y la región C de cadena H humana se introducen dentro de un vector de expresión único (véase, por ejemplo, WO94/11523) y dicho vector se utiliza para transformar una célula anfitriona; luego, el anfitrión transformado se cultiva in vivo o in vitro para producir un anticuerpo quimérico deseado.

45 El vector para la expresión de la cadena H de un anticuerpo quimérico se puede obtener al introducir cADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región V de cadena H de ratón (denominado aquí adelante como también "cADN para la región V de cadena H") dentro de un vector de expresión adecuado que contiene el ADN genómico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la región C de cadena H del anticuerpo humano (denominado aquí adelante como también "ADN genómico para la región C de cadena H") o el cADN que codifica dicha región (denominado aquí adelante como también "cADN para la región C de cadena H"). La región C de cadena H incluye, por ejemplo, regiones C gamma 1, C gamma 2, C gamma 3 o C gamma 4.

50 Los vectores de expresión que tienen el ADN genómico que codifica la región C de cadena H, en particular, aquellos que codifican la región C gamma 1, incluyen, por ejemplo, HEF-PMh-g gamma 1 (WO92/1975) y DHER-INCREMENT E-RVh-PM1-f (WO92/19759). Alternativamente, la colección de región constante humana se puede preparar utilizando cADN del PBMC humano (células mononucleares de sangre periférica) como se describió anteriormente (Liu, A.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 3439-43, 1987; Reff, M.E. et al., Blood, Vol. 83, No. 2, 435-45, 1994).

- 5 Cuando el dADN que codifica la región V de cadena H de ratón se inserta dentro de estos vectores de expresión, se puede introducir una secuencia de nucleótidos apropiada en dicho cADN a través de PCR. Por ejemplo, se puede efectuar PCR utilizando un cebador PCR que se diseña de tal manera que dicho cADN tiene una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción adecuada en su extremo 5' y la secuencia consensus Kozak inmediatamente antes del codón de inicio del mismo con el fin de mejorar la eficiencia de transcripción, así como también un cebador PCR que se diseña de tal manera que dicho cADN tiene una secuencia de reconocimiento para una enzima de restricción adecuada en su extremo 3' y un sitio de donante de empalme para empalmar apropiadamente los productos de transcripción primarios del ADN genómico para dar un mRNA, para introducir estas secuencias de nucleótidos apropiadas dentro del vector de expresión.
- 10 El ADN así construido que codifica la región V de cadena H de ratón se trata con una enzima de restricción adecuada, luego se inserta dentro de dicho vector de expresión para construir un vector de expresión quimérico de cadena H que contiene el ADN de genoma que codifica la región C de cadena H (región C gamma 1).
- 15 El cADN así construido que codifica la región V de cadena H de ratón se trata con una enzima de restricción adecuada, ligada al cADN que codifica dicha región C de cadena H C gamma 1, y se inserta dentro de un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech) para construir un vector de expresión que contiene el cADN que codifica una cadena H quimérica.
- 20 El vector para la expresión de cadena L de un anticuerpo quimérico se puede obtener al ligar un cADN que codifica la región V de cadena L de ratón y un ADN genómico o cADN que codifica la región C de cadena L de un anticuerpo humano e introducir en un vector de expresión adecuado. La región C de cadena L incluye, por ejemplo, cadena kappa y cadena lambda.
- 25 Cuando se construye un vector de expresión que contiene el cADN que codifica la región V de cadena L de ratón, las secuencias de nucleótidos apropiadas tal como una secuencia de reconocimiento o secuencia consensus Kozak se puede introducir en dicho vector de expresión a través del método PCR.
- 30 La secuencia de nucleótidos completa de cADN que codifica la región C de cadena lambda L humana se puede sintetizar mediante un sintetizador de ADN y se construye a través del método PCR. La región C de cadena lambda L humana se sabe que tiene por lo menos 4 isotipos diferentes y se puede utilizar cada isotipo para construir un vector de expresión.
- 35 El cADN construido que codifica la región C de cadena Lambda L humana y el cADN construido anteriormente que codifica la región V de cadena L de ratón se puede ligar entre los sitios de enzima de restricción adecuados y se inserta en un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech), para construir un vector de expresión que contiene el cADN que codifica una cadena lambda L de un anticuerpo quimérico.
- 40 El ADN que codifica la región C de cadena kappa L humana que se va a ligar al ADN que codifica la región V de cadena L de ratón se puede construir de, por ejemplo, HEF-PM1k-gk que contiene el ADN genómico (véase documento WO92/19759). Alternativamente, la colección de región constante humana se puede preparar utilizando cADN del PBMC humano (células mononucleares de sangre periférica) como se describió previamente (Liu, A.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 84, 3439-43, 1987; Reff, M.E. et al., Blood, Vol. 83, No. 2, 435-45, 1994).
- 45 Se pueden introducir las secuencias de reconocimientos para las enzimas de restricción adecuadas, a través del método PCR, en los extremos 5'- y 3' del ADN que codifica la región C de cadena kappa L, y el ADN que codifica la región V de cadena L de ratón como se construyó anteriormente y el ADN que codifica la región C de cadena kappa L se puede ligar entre sí y se inserta dentro de un vector de expresión tal como pQCXIH (Clontech) para construir un vector de expresión que contiene el cADN que codifica la cadena kappa L de un anticuerpo quimérico.
- 50 Con el fin de hacer un anticuerpo humanizado en el que CDR de un anticuerpo monoclonal de ratón se injerta a un anticuerpo humano, es deseable que exista una alta homología entre FR del anticuerpo monoclonal de ratón y FR del anticuerpo humano. De acuerdo con lo anterior, se hace una comparación entre las regiones V de H y las cadenas L de anticuerpo monoclonal anti-FZD10 de ratón y las regiones V de todos los anticuerpos conocidos cuyas estructuras se han elucidado con el uso del Banco de Datos de Proteínas. Adicionalmente, estos se comparan simultáneamente con los subgrupos de anticuerpo humano (HSG: Subgrupo humano) clasificado por Kabat et al. con base en la longitud del anticuerpo FR, la homología de aminoácidos, y similares: Kabat, E.A. et al, US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991.
- 50 La primera etapa para diseñar el ADN que codifica una región V de anticuerpo humanizado es seleccionar una región V de anticuerpo humano como una base para el diseño. Por ejemplo, FR de una región V de anticuerpo humano que tiene una homología de más de 80% con FR de una región V de anticuerpo de ratón se puede utilizar en la producción de un anticuerpo humanizado.

En el anticuerpo humanizado, la región C y las regiones de estructura principal (FR) de la región V de dicho anticuerpo se originan de las regiones humanas y determinantes de complementariedad (CDR) y la región V se originan de ratón. Un polipéptido que comprende la región V del anticuerpo humanizado se puede producir en la forma denominada injerto de CDR mediante el método PCR mientras que un fragmento de ADN de un anticuerpo humano estaría disponible como una plantilla. El "injerto de CDR" se refiere a un método en donde un fragmento de ADN que codifica un CDR derivado de ratón se hace y se reemplaza para el CDR de un anticuerpo humano como una plantilla.

Si no está disponible un fragmento de ADN de un anticuerpo humano que se va a utilizar como una plantilla, se puede sintetizar una secuencia de nucleótidos registrada en una base de datos de un sintetizador de ADN y un ADN para una región V de un anticuerpo humanizado se puede producir por el método PCR. Adicionalmente, solo cuando se registra una secuencia de aminoácidos en la base de datos, la secuencia de nucleótidos completa se puede deducir de la secuencia de aminoácidos sobre la base del conocimiento del uso del codón en anticuerpos como se reporta por Kabat, E.A. et al. in US Dep. Health and Human Services, US Government Printing Offices, 1991. Esta secuencia de nucleótidos se sintetiza en un sintetizador de ADN y se puede preparar un ADN de una región V de anticuerpo humanizado mediante el método PCR y se introduce dentro de un anfitrión adecuado seguido por la expresión del mismo para producir el polipéptido deseado.

Los procedimientos generales de injerto de CDR mediante el método PCR se describen adelante cuando está disponible un fragmento de ADN de un anticuerpo humano como una plantilla.

En primer lugar, se sintetizan los fragmentos de ADN derivados de ratón que corresponden a los CDR respectivos. Los CDR 1 a 3 se sintetizan sobre una base de las secuencias de nucleótidos de las regiones V de cadena L y H de ratón previamente clonadas.

El ADN para la región V de cadena H de un anticuerpo humanizado se puede ligar al ADN para cualquier región C de cadena H de anticuerpo humano, por ejemplo, región gamma 1 C de cadena H humana. Como se mencionó anteriormente, el ADN para la región V de cadena H se puede tratar con una enzima de restricción adecuada y se liga al ADN que codifica a la región C de cadena H humana bajo un elemento de control de expresión tal como un sistema mejorador/promotor para hacer un vector de expresión que contiene los ADN para una región humanizada y región V de cadena H y una región C de cadena H humana.

El ADN para la región V de cadena L de un anticuerpo humanizado se puede ligar al ADN para cualquier región C de cadena L de anticuerpo humano, por ejemplo, región lambda C de cadena L humana. El ADN para la región V de cadena L se puede tratar con una enzima de restricción adecuada y se liga al ADN que codifica a la región C de cadena Lambda L humana bajo un elemento de control de expresión tal como un sistema de mejorador/promotor para hacer un vector de expresión que contiene los ADN que codifican una región V de cadena L humanizada y una región C de cadena Lambda L humana.

El ADN que codifica la región V de cadena H de un anticuerpo humanizado y una región C de cadena H humana y el ADN que codifica a región V de cadena L humanizada y la región C de cadena L humana también se puede introducir dentro de un vector de expresión único tal como aquella descrita en el documento WO 94/11523, dicho vector se puede utilizar para transformar una célula anfitriona, y el anfitrión transformado se puede cultivar in vivo o in vitro para producir un anticuerpo humanizado deseado.

Para producir un anticuerpo quimérico o humanizado, se deben preparar dos vectores de expresión como se mencionó anteriormente. Sin embargo, con respecto a un anticuerpo quimérico, se construyen un vector de expresión que comprende un ADN que codifica a la región V de cadena H de ratón y una región C de cadena H humana bajo el control de un elemento de control de expresión tal como un mejorador/promotor, y un vector de expresión que comprende el ADN que codifica a la región V de cadena L de ratón y a la región C de cadena L humana bajo el control de un elemento de control de expresión. Con respecto a un anticuerpo humanizado, se construyen un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de cadena H humanizada y una región C de cadena H humana bajo el control de un elemento de control de expresión, y un vector de expresión que comprende un ADN que codifica una región V de cadena L humanizada y una región C de cadena L humana bajo el control de un elemento de control de expresión.

Luego, una célula anfitriona tal como una célula de mamífero (por ejemplo, célula COS) se puede contrtransformar con estos vectores de expresión y la célula transformada resultante se puede cultivar in vitro o in vivo para producir el anticuerpo humanizado o quimérico (véase, por ejemplo, documento WO91/16928).

Alternativamente, el ADN que codifica las regiones V y C de cadena H y un ADN que codifica las regiones V y C de cadena L se puede ligar a un vector único y se transforma en una célula anfitriona adecuada para producir un anticuerpo. Sin embargo, en la expresión de un anticuerpo quimérico, el ADN que codifica una secuencia líder de ratón presente en el cADN clonado, una región V de cadena H de ratón y una región C de cadena H humana así

como también el ADN que codifica una secuencia líder de ratón, una región V de cadena L de ratón y una región C de cadena L humana, se pueden introducir dentro de un vector de expresión único tal como el descrito en por ejemplo documento WO 94/11523. En la expresión de un anticuerpo humanizado, el ADN que codifica una región V de cadena H humanizada y una región C de cadena H humana y el ADN que codifica una región V de cadena L humanizada y una región C de cadena L humana se pueden introducir dentro de un vector de expresión único tal como el descrito en por ejemplo documento WO 94/11523. Se utiliza dicho vector para transformar una célula anfitriona y el anfitrión transformado se cultiva in vivo o in vitro para producir un anticuerpo quimérico o humanizado de interés.

Se puede utilizar cualquier sistema de expresión para producir el anticuerpo humanizado o quimérico contra la proteína FZD10 de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, las células eucarióticas incluyen células de animal tal como estirpes celulares de mamífero establecidas, células fúngicas, y células de levadura; células procarióticas que incluyen células bacterianas tal como *Escherichia coli*. Preferiblemente, el anticuerpo humanizado o quimérico de la presente invención se expresa en una célula de mamífero tal como célula COS o CHO.

Se pueden utilizar cualesquier promotores convencionales para la expresión en células de mamífero. Por ejemplo, se utiliza preferiblemente el promotor temprano inmediato de citomegalovirus humano (HCMV). Adicionalmente, los promotores para expresión de gen en células de mamífero pueden incluir promotores de virus, tal como aquellos de retrovirus, virus polio, adenovirus y virus de simio 40 (SV), y promotores derivados de célula de mamífero, tal como aquellos del factor-1 alfa de elongación de cadena de polipéptido humana (HEF-1 alfa). Por ejemplo, el promotor SV40 se puede utilizar fácilmente de acuerdo con el método de Mulligan et al. (*Nature*, 277, 108-14, 1979); método Mizushima, S. et al. (*Nucleic Acids Research*, 18, 5322, 1990) se puede utilizar fácilmente con el promotor HEF-1 alfa.

El origen de replicación incluye aquellos derivados de SV40, virus polio, adenovirus o virus de papiloma bovino (BPV). Adicionalmente, el vector de expresión puede comprender un gen para fosfotransferasa APH(3') II o I (neo), quinasa timidina (TK), fosforibosiltransferasa xantina-guanina *E. coli* (Ecogpt) o dihidrofolato reductasa (DHFR) como un marcador selectivo para aumentar el número de copia de genes en un sistema de célula anfitriona.

El anticuerpo humanizado o quimérico de interés que así se produce al cultivar el transformante transformado con un ADN que codifica el anticuerpo humanizado o quimérico se puede aislar de la célula y luego se purifica.

El aislamiento y purificación del anticuerpo humanizado o quimérico de interés se puede llevar a cabo al utilizar una columna de agarosa de proteína A, pero también se puede realizar por cualquiera de los métodos utilizados para aislamiento y purificación de una proteína y así no se limita. Por ejemplo, se puede seleccionar opcionalmente una cromatografía, ultrafiltración, precipitación salina y diálisis o combinar para aislar y purificar el anticuerpo humanizado o quimérico.

Después de aislar el anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado, la concentración del anticuerpo purificado resultante se puede determinar mediante ELISA.

La determinación de la actividad de unión a antígeno u otras actividades que incluyen la actividad de unión a una célula normal del anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado se puede realizar mediante cualesquiera métodos conocidos (*Antibodies A Laboratory Manual*, Ed. Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988).

Como el método para la determinación de la actividad de unión a antígeno de un anticuerpo, se pueden emplear técnicas tal como ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), EIA (inmunoensayo de enzima), RIA (radioinmunoensayo) o ensayo fluorescente.

(3) Fragmento de anticuerpo y Anticuerpo modificado

El anticuerpo utilizado en la presente invención puede ser cualquier fragmento del mismo o un anticuerpo modificado, mientras que se puede unir a la proteína FZD10 e inhibir su actividad. Por ejemplo, el fragmento del anticuerpo incluye Fab, F(ab')₂, Fv, o un Fv de cadena sencilla (scFv) compuesto de un fragmento Fv de cadena H o un fragmento Fv de cadena L ligados a través de un ligador adecuado. Específicamente, dicho fragmento de anticuerpos se puede producir al dividir el anticuerpo con una enzima (por ejemplo, papaína, pepsina) en los fragmentos de anticuerpo, o al construir un gen que codifica el fragmento de anticuerpo e insertar el gen dentro de un vector de expresión e introducir el vector recombinante de expresión resultante dentro de una célula anfitriona adecuada, por lo que se expresa el fragmento de anticuerpo (véase, por ejemplo, Co, M. S., et al., *J. Immunol.* (1994), 152, 2968-76; Better, M. & Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology* (1989), 178, 476-96, Academic Press, Inc.; Pluckthun, A. & Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-63; Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-9; y Bird, R.E. et al., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-7). Alternativamente, se pueden construir colección de expresión Fab (Huse et

al., 1989, Science, 246: 1275-81) para permitir la identificación rápida y fácil de los fragmentos Fab monoclonales con la especificidad deseada.

Se puede producir un scFv por ligar la región V de cadena H a la región V de cadena L a través de un ligador, preferiblemente un ligador de péptido (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-83). La región V de cadena H y la región V de cadena L en el scFv se pueden derivar de uno cualquiera de los anticuerpos descritos allí. El ligador de péptido que se une a las regiones V puede ser cualquier péptido de cadena sencilla, por ejemplo, de 12-19 residuos de aminoácido.

Como un anticuerpo modificado, por ejemplo, también se puede utilizar el anticuerpo anti-FZD10 o fragmento del mismo conjugado a cualquier molécula (por ejemplo, polietilenglicol). Dichos anticuerpos modificados también se abarcan en el "anticuerpo" de la presente invención. Los anticuerpos modificados se pueden preparar mediante modificaciones químicas de los anticuerpos. Las técnicas de modificación química adecuadas para este propósito ya se han establecido en la técnica.

2. USOS TERAPÉUTICOS

Se describen adelante métodos y composiciones farmacéuticas para tratar y/o evitar la enfermedad asociada con FZD10 utilizando el anticuerpo de la presente invención. El resultado de un tratamiento es por lo menos producir en un sujeto tratado un beneficio saludable, que en el caso de los tumores, incluye pero no se limita a remisión de los tumores, paliación de los síntomas de los tumores, y control de propagación metastásica de los tumores.

Específicamente, el método para tratar y/o evitar la enfermedad asociada con FZD10 en un sujeto de acuerdo con la presente invención comprende administrar a un sujeto en necesidad del mismo el anticuerpo o el fragmento descrito anteriormente.

El término "sujeto" aquí se refiere a un sujeto que ha sufrido de la enfermedad asociada con FZD10 y también un sujeto que se sospecha tiene la enfermedad asociada con FZD10. El sujeto en la presente invención puede ser animales que incluyen mamíferos y animales aviares. Por ejemplo, los mamíferos pueden incluir humanos, ratones, ratas, monos, conejos, y perros.

El término "enfermedad asociada con FZDIO" aquí se refiere a una enfermedad asociada con la sobreexpresión de la proteína FZDIO. Específicamente, las enfermedades asociadas con FZDIO se limitan a, sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

El anticuerpo o fragmento del mismo descrito aquí se puede unir específicamente a la proteína FZDIO, cuando el anticuerpo o fragmento del mismo se administra a un sujeto, se une a la proteína FZDIO en el sujeto y se puede inhibir la actividad de la proteína FZDIO. El anticuerpo o fragmento del mismo se conjuga con una unidad estructural terapéutica y se administra a un sujeto, se suministra a una región que expresa la proteína FZDIO (es decir región que sufre) en un sujeto y la unidad estructural terapéutica se puede suministrar selectivamente a la región que sufre y actúa sobre este. Dicha unidad estructural terapéutica puede ser cualesquier terapéuticos que se conocen o se desarrollarán por tener una eficacia terapéutica en enfermedad asociada de FZDIO de una marca de radioisótopo (radionucleótido) y agente quimioterapéutico, es decir un fármaco antineoplásico. Una marca de radioisótopo que se puede utilizar como los terapéuticos se puede seleccionar dependiendo de una variedad de elementos que incluyen energía de rayos β y su eficiencia de emisión, la presencia o ausencia de rayos γ emitidos, su eficiencia de emisión y energía, vida útil física, y procedimiento de marca. De manera general, se puede utilizar la marca de radioisótopo con base en itrio (tal como ^{90}Y) y yodo (tal como ^{125}I y ^{131}I). Un agente quimioterapéutico puede ser cualquier agente que se conoce o se desarrollará para tratar la enfermedad asociada con FZDIO e incluye, pero no se limita a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatina, carboplatina, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, y docetaxel. El anticuerpo o fragmento del mismo descrito aquí se puede unir selectivamente a la proteína FZDIO y no se une a una célula normal, así el efecto colateral se provoca por el anticuerpo o fragmento del mismo, o radioisótopo o agente quimioterapéutico se puede evitar efectivamente y por lo tanto puede ser alta la potencia terapéutica.

El anticuerpo o fragmento del mismo descrito aquí se puede administrar a un sujeto en dosis efectivas para tratar o evitar la enfermedad asociada con FZDIO. Una dosis efectiva se refiere a aquella cantidad de un anticuerpo o un fragmento del mismo suficiente para resultar en un beneficio saludable en el sujeto tratado. Las formulaciones y métodos de administración que se pueden emplear cuando la composición farmacéutica contiene un anticuerpo de la presente invención se describen adelante. Las composiciones farmacéuticas para uso de acuerdo con la presente invención se pueden formular en forma convencional utilizando uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden formular para administración parenteral (es decir, intravenosa o intramuscular) mediante inyección, vía, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua. Las

formulaciones para inyección pueden estar presentes en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en contenedores multi-dosis, con un conservante adicionado.

5 Las composiciones pueden tomar dichas formas como suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos acuosos o aceitosos, y pueden contener agentes formuladores tal como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el anticuerpo puede estar en la forma de polvo liofilizado para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógeno estéril, antes de uso.

10 La toxicidad y eficacia del anticuerpo o fragmento, o la unidad estructural terapéutica conjugada a la misma se puede determinar mediante procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, para determinar el LD₅₀ (la dosis letal a 50 % de la población) y el ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación LD/ED.

15 Se prefieren los anticuerpos o unidades estructurales terapéuticas que exhiben grandes índices terapéuticos. Aunque se pueden utilizar anticuerpos o unidades estructurales que exhiben efectos tóxicos colaterales, se debe tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirige dichos anticuerpos o unidades estructurales al sitio de tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, por lo tanto, reducir los efectos colaterales.

20 Los datos obtenidos de ensayos de cultivo celular y estudios de animal se pueden utilizar en la formulación de un rango de dosificaciones para uso en humanos. La dosificación de dichos anticuerpos se encuentra preferiblemente dentro de un rango para circular las concentraciones de plasma que incluyen el ED₅₀ con poca o sin toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este rango dependiendo de la forma de dosificación empleada, la ruta de administración utilizada y los tipos y cantidades de la unidad estructural terapéutica conjugada. Para cualquier anticuerpo utilizado en el método de la invención, la dosis efectiva se puede estimar inicialmente de ensayos de cultivo celular. Se puede formular una dosis en modelos de animal para lograr un rango de concentración de plasma circulante que incluye el IC₅₀ (es decir, la concentración del anticuerpo de prueba que logra una inhibición máxima promedio de los síntomas) como se determina en el cultivo celular. Se puede utilizar dicha información para determinar más exactamente las dosis útiles en los humanos. Se pueden medir los niveles en plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alto desempeño.

30 Dependiendo de las condiciones y la edad del sujeto y/o la ruta de administración, un experto en la técnica puede seleccionar una dosis apropiada de la composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en una cantidad de tal manera que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se administra al sujeto en un día en una cantidad de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal del sujeto, y preferiblemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal del sujeto. El intervalo de administración y los tiempos se pueden seleccionar en consideración con la afección y edad del sujeto, la ruta de administración, y respuesta a la composición farmacéutica. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede administrar al sujeto de una a 5 veces, preferiblemente 1 vez al día durante 5 a 10 días.

35 La composición farmacéutica se puede administrar sistémicamente o localmente. Se administra preferiblemente en una forma de suministro objetivo con el fin de suministrar el componente activo a un sitio afectado.

40 En realizaciones particulares, los métodos y composiciones de la presente invención se utilizan para el tratamiento o prevención de la enfermedad asociada con FZD10 junto con uno o una combinación de agentes quimioterapéuticos que incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, taxol, mercaptopurina, tioguanina, cisplatina, carboplatina, mitomicina, bleomicina, doxorubicina, idarubicina, daunorubicina, dactinomicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, paclitaxel, y docetaxel.

45 Con respecto a la terapia de radiación, se puede utilizar cualquier protocolo de terapia de radiación dependiendo del tipo de enfermedad asociada con FZD10 que se va a tratar. Por ejemplo; pero no por vía de limitación, se puede administrar radiación de rayos X. Los radioisótopos de emisión de rayos gamma, tal como isótopos radioactivos de radio, cobalto, y otros elementos también se puede administrar para exponer los tejidos.

50 En otra realización, se administra quimioterapia o terapia de radiación, preferiblemente por lo menos una hora, cinco horas, 12 horas, un día, una semana, un mes, y más preferiblemente varios meses (por ejemplo, hasta tres meses) posteriormente al utilizar los métodos y composiciones que contienen el anticuerpo de la presente invención. La quimioterapia o terapia de radiación administrada antes de, concurrentemente con, o posteriormente al tratamiento utilizando los métodos y composiciones de acuerdo con la presente invención se pueden administrar mediante cualquier método conocido en la técnica.

3. USOS DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

Los anticuerpos dirigidos contra la proteína FZD10 o fragmentos de los mismos también se pueden utilizar como diagnósticos y pronósticos, como se describe aquí. Se pueden utilizar dichos métodos diagnósticos para detectar la presencia o ausencia de la enfermedad asociada con FZD10 y el riesgo de tener enfermedad. El método para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad asociada con FZD10 de la presente invención comprende detectar inmunológicamente o determinar la proteína FZD 10 derivada de la enfermedad en una muestra utilizando un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la presente invención. Específicamente, un método para el diagnóstico o pronóstico de la enfermedad asociada con FZD10 o de una predisposición de desarrollar la enfermedad en un sujeto de acuerdo con la presente invención comprende:

- (a) poner en contacto una muestra del sujeto con un anticuerpo contra la proteína FZD10 o un fragmento del mismo;
- (b) detectar la proteína FZD10 en la muestra; y
- (c) juzgar si o no el sujeto sufre de o está en riesgo de desarrollar la enfermedad con base en la abundancia relativa de la proteína FZD10 comparado con a control.

El método para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención se puede realizar con base en cualesquier procedimientos, mientras es un ensayo utilizando un anticuerpo, es decir, un ensayo inmunológico. Por lo tanto uno puede detectar la proteína FZD10 utilizando el anticuerpo o un fragmento del mismo de la presente invención como el anticuerpo utilizado en el ensayo. Por ejemplo, la proteína FZD10 se puede detectar al utilizar una tinción inmunohistoquímica, inmunoensayo tal como inmunoensayos de enzima (ELISA y EIA), ensayo inmunofluorescente, radioinmunoensayo (RIA), o Western blot.

Una muestra que se va a probar en el método para el diagnóstico y/o pronóstico de la enfermedad asociada con FZD10 de la presente invención no se limita específicamente, mientras es una muestra biológica que puede contener la proteína FZD10 derivada de la enfermedad asociada con FZD10. Ejemplos de la muestra incluyen la extracción de una célula u órgano, y secciones de tejido, así como también sangre, suero, plasma, sobrenadante cultivado con linfocito, orina, fluido espinal, saliva, sudor, y ascitis. La abundancia de la proteína FZD10 según se determina en las muestras tal como tejido de tumor, biopsia de tumor, y tejido metástasis al utilizar el anticuerpo o un fragmento del mismo de la presente invención es específicamente útil como un índice de una enfermedad asociada con FZD 10.

Por ejemplo, los anticuerpos y fragmentos de los mismos descritos aquí se pueden utilizar para detectar cuantitativamente o cualitativamente la proteína FZD10. Los anticuerpos (o fragmento del mismo) de la presente invención, adicionalmente, se pueden emplear histológicamente, como en microscopía de inmunofluorescencia o inmunolectrones y, para detección in situ de la proteína FZD10. Se puede llevar a cabo detección in situ al retirar una muestra histológica de un sujeto, tal como secciones embebidas de parafina de tejidos (tal como especímenes quirúrgicos) y aplicarlas a las misma un anticuerpo marcado de la presente invención. El anticuerpo (o fragmento del mismo) se aplica preferiblemente al superponer una muestra con el anticuerpo marcado (o fragmento del mismo). Utilizando la presente invención, aquellos expertos en la técnica pueden percibir fácilmente que cualquiera de una amplia variedad de métodos histológicos (tal como procedimientos de tinción) se puede modificar con el fin de lograr dicha detección in situ.

Los inmunoensayos para la proteína FZD10 comprenderán normalmente incubar una muestra de un sujeto que se va a examinar, tal como un fluido biológico, un extracto de tejido, células frescamente cosechadas, o lisados de las células que se han incubado en el cultivo celular, en la presencia de un anticuerpo marcado detectablemente de la presente invención, y detectar el anticuerpo unido mediante un número de técnicas bien conocidas en el arte.

La muestra se puede poner en contacto con y se inmoviliza en un soporte de fase sólida o portador tal como nitrocelulosa, u otro soporte sólido que es capaz de inmovilizar células, partículas de células, o proteínas solubles. El soporte luego se puede lavar con reguladores adecuados seguido por tratamiento con el anticuerpo marcado detectablemente contra FZD10. El soporte de fase sólida luego se puede lavar con el regulador una segunda vez para retirar el anticuerpo no unido. La cantidad de marca unida en el soporte sólido luego se puede detectar mediante medios convencionales.

El término "soporte de fase sólida o portador" significa cualquier soporte capaz de unir un antígeno o un anticuerpo. Aquellos expertos en la técnica conocerá cualesquiera portadores adecuados para unir anticuerpos o antígenos, o será capaz de determinar los mismos mediante uso de experimentación de rutina.

Se puede determinar la actividad de unión de un lote dado de anticuerpo anti-FZD10 de acuerdo con métodos bien conocidos. Aquellos expertos en la técnica serán capaces de determinar las condiciones de ensayo operativas y óptimas para cada determinar al emplear experimentación de rutina.

Para detectar una reacción entre el anticuerpo (o su fragmento) de la presente invención y la proteína FZD 10 derivada de una enfermedad asociada con el sitio afectado FZD10 en una muestra fácilmente, la reacción se puede detectar fácilmente al marcar el anticuerpo de la presente invención o detectar indirectamente al utilizar un anticuerpo secundario marcado. El procedimiento de detección indirecto, tal como un ensayo de intercalado o ensayo competitivo de ELISA, se utiliza preferiblemente en el método de la presente invención para mejor sensibilidad.

Ejemplos de marcas para uso aquí son como sigue. Se pueden utilizar peroxidasa (POD), fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, ureasa, catalasa, glucosa oxidasa, lactato deshidrogenasa, amilasas, y complejos de biotina-avidina en un inmunoensayo de enzima. Se puede utilizar isotiocianato fluoresceína (FITC), tetrametilrodamina isotiocianato (TRITC), rodamina isotiocianata sustituida, diclorotriazina isotiocianato y Alexa488 en un ensayo inmunofluorescente. Se puede utilizar tritio, yodo (tal como ^{125}I , y ^{131}I), e indio (tal como ^{111}In) en un radioinmunoensayo. Se puede utilizar ensayo de NADH-FMN₂-luciferasa, sistema de peróxido-POD de luminol-hidrógeno, ésteres de acridinio, y compuestos dioxetano en un ensayo inmunoluminiscente.

La marca se puede unir al anticuerpo de acuerdo con un procedimiento convencional. Por ejemplo, la marca se puede unir al anticuerpo mediante un método de glutaraldehído, método de maleimida, método de piridil disulfuro, o método de peryodato en el inmunoensayo de enzima, y mediante un método de cloramina T o método de Bolton-Hunter en el radioinmunoensayo.

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

Por ejemplo, cuando el anticuerpo de la presente invención se marca directamente con la marca descrita anteriormente, la muestra se pone en contacto con el anticuerpo marcado por lo tanto para formar un complejo entre la proteína FZD10 y el anticuerpo. Luego, se separa el anticuerpo marcado no unido, y el nivel de la proteína FZD10 en la muestra se puede determinar con base en la cantidad del anticuerpo marcado unido o del anticuerpo marcado no unido.

Cuando se utiliza un anticuerpo secundario marcado, el anticuerpo de la presente invención se deja reaccionar con la muestra en una reacción primera, y el complejo resultante se deja reaccionar con el anticuerpo secundario marcado en una reacción secundaria. La reacción primaria y la reacción secundaria se pueden desarrollar en orden inverso, concurrentemente con algún intervalo de tiempo entre estas. La reacción primaria y la reacción secundaria producen un complejo de [proteína FZD10]-[anticuerpo de la invención]-[anticuerpo secundario marcado] o un complejo de [anticuerpo de la invención]-[proteína FZD10]-[anticuerpo secundario marcado]. El anticuerpo secundario marcado no unido luego se separa, y el nivel de la proteína FZD10 en la muestra se puede determinar con base en la abundancia del anticuerpo secundario marcado unido o aquel anticuerpo secundario marcado no unido.

De acuerdo con otra realización, el anticuerpo de la presente invención se marca con un radioisótopo o una marca fluorescente, y el anticuerpo marcado se administra parenteralmente a un sujeto. Sin embargo, la ubicación de un tumor primario y el tumor con metástasis relacionado de la enfermedad asociada con FZD10 se puede encontrar rápidamente en una forma no invasiva. Dicho método de diagnóstico se conoce como formación de imágenes de tumor in vivo, y un experto en la técnica puede entender fácilmente los procedimientos de los mismos. El anticuerpo marcado se puede administrar al sujeto sistémicamente o localmente, preferiblemente a través de una ruta parenteral tal como inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, o inyección subcutánea.

Los anticuerpos de acuerdo con la presente invención específicamente reaccionan con la proteína FZD10 como se mencionó anteriormente y por lo tanto se pueden utilizar en equipos para el diagnóstico y/o pronóstico de una enfermedad asociada con FZD10.

El equipo para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo descrito aquí. Al detectar la proteína FZD10 en una muestra de un sujeto que se sospecha sufre de una enfermedad asociada con FZD10 con el uso del equipo para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención, si o no el sujeto sufre de la enfermedad asociada con FZD10 puede ser comprobada fácilmente y rápidamente. Los equipos para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades utilizando dichas reacciones inmunológicas se han conocido ampliamente, y un experto en la técnica puede seleccionar los componentes apropiados diferentes al anticuerpo. Los equipos para el diagnóstico y/o pronóstico de la presente invención se pueden utilizar en cualquier medio, mientras que significa inmunoensayo.

EJEMPLOS:

La presente invención se ilustrará adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

Las estirpes celulares y especímenes de tejido utilizados en los siguientes ejemplos se preparan como se describe adelante. Específicamente, las estirpes celulares derivadas de sarcoma sinoviales (HS-SY-2, YaFuSS, 1973/99, Fuji y SYO-1), cánceres de colon (LoVo, SNUC4 y SNU-C5), células HEK293 y COS7 se cultivan en monocapas en medio apropiado complementado con 10 % de suero bovino fetal y 1 % de solución de antibiótico/antimicótico, y se mantiene a 37° C en aire que contiene 5 % de CO₂. Las muestras de sarcoma sinovial primarias (SS) se obtienen después de consentimiento informado, y se congelan a presión en nitrógeno líquido inmediatamente después de resección y se almacena a -80° C

Ejemplo 1

Generación de anticuerpos monoclonales anti-FZD10

10 (1) Generar anticuerpos monoclonales con inmunización de células

Se generan anticuerpos monoclonales anti-FZD10 de ratón (Mabs) al inmunizar ratones Balb/c hembra de cuatro semanas de edad en las almohadillas de sus patas con 2×10^7 células COS-7 transfectadas con 2×10^7 de pCAGGS/neo-FZD10-myc/His (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japón). Se reporta la construcción de pCAGGS/neo-FZD10-mjrc/His previamente (Nagayama, S., et al. (2005). *Oncogene*, 24, 6201-12.) y esto expresa la secuencia codificante completa del cADN FZD10 y etiquetas de epítipo Myc y His en su terminal C. Los ratones se han inmunizado con adyuvante completo de Freund (Mitsubishi Kagaku Iatron, Inc., Tokyo, Japón) un día antes de inmunización celular. Las células de bazo de ratones inmunizados se cosechan y se fusionan con la estirpe celular de mieloma. Los hibridomas se subclonan y se evalúan mediante ELISA celular por la capacidad de secretar inmunoglobulina que se une al dominio extracelular de FZD10 (residuos de aminoácido 1-225 de FZD10). Para ELISA celular, las células COS-7 que expresan FZD10-myc/His (la secuencia codificante completa de cADN FZD10 y las etiquetas de epítipo Myc y His en su terminal C) se siembran en placas de 96 pozos. Posteriormente, se agregan 50 ml de sobrenadantes de cultivo obtenidos de hibridomas a la placa y se incuban durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células, se agrega IgG-POD anti-ratón de cabra (Medical and Biological Laboratories, Nagoya, Japón) en dilución 1:10000, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se detectan anticuerpos unidos a OD450-620nm. Los clones positivos se analizan adicionalmente para actividad de unión específica. Estos clones incluyen: clones 39-2 y 39-10 (descritos en el documento WO2005/004912, denominado como 5F2) así como también 92-13 y 93-22. Todos los Mabs son del isotipo IgG2a según se determina por medio del equipo de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip (Roche). Los Mabs se purifican en afinidad en proteína G-sefarosa para caracterización adicional.

30 El clon de hibridoma 93-22 que produce el anticuerpo monoclonal de ratón 93-22 se deposita por Shuichi Nakatsuru internacionalmente en el IPOD International Patent Organism Depository del National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-Ken, 305-8566 Japón) de Junio 14, 2006 bajo el número de depósito de FERM BP-10620. También, el clon de hibridoma 92-13 que produce el anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 se deposita por Shuichi Nakatsuru internacionalmente en el Organismo de IPOD International Patent Organism Depository del National Institute of AIST de Junio 28, 2006 bajo el número de depósito de FERM BP-10628.

(2) Anticuerpos marcados con radionúclidos

Se preparan Mab marcados ¹²⁵I mediante el método cloramina T (Arano, Y, et al. (1999). *Cancer Res*, 59, 128-34.). Se agrega 740 kBq/2 µl de Na¹²⁵I a 10 µg de Mab en 100 µl de regulador de fosfato de sodio 0.3M. Se agrega adicionalmente un µg de cloramina-T en 3 ml de regulador de fosfato de sodio 0.3M, se incuba durante 5 min a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se purifica utilizando columna Biospina 6 (Bio-Rad).

Para Mab marcados con ¹¹¹In, 1mg de Mab en 100 ml de regulador de borato 50 mM (pH 8.5) se conjuga a ácido dietilenotriaminopentaacético de bencil isotiocianato (SCN-BZ-DTPA; Macrocyclics) en dimetilformamida en relación molar 1:3. Después de incubación a 37° C durante 20 horas, los conjugados Mab se purifican utilizando columna Biospina 6. 40 ml de ¹¹¹In se incuba en 60 ml de regulador de ácido acético 0.25M (pH 5.5) y se incorpora en 10 mg/ml de conjugados Mab-DTPA durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo marcado se purifica utilizando columna Biospina 6.

Para generar 92-13, 92-13 conjugado con ⁹⁰Y se conjuga con DTPA a residuos lisina. Se marca DTPA-92-13 con itrio en una actividad específica 100 mCi/mg, y la inmunoreactividad del ⁹⁰Y-DTPA-92-13 es aproximadamente 70%.

50 (3) Síntesis de Mab marcados Alexa647.

Los Mab marcados con Alexa-Fluoro647 se llevan a cabo de acuerdo con la instrucción del fabricante utilizando el Equipo de Marca de Anticuerpo Monoclonal Alexa647 (Molecular Probes, Eugene, Oregon). El tinte reactivo

Alexa647 tiene una unidad estructura de éster succinimidilo que reacciona con aminas primarias de proteínas, y se purifican los conjugados tinturados con Mab resultantes mediante columna de exclusión de tamaño.

Ejemplo 2

Actividades de unión de anticuerpos monoclonales anti-FZD10

5 Los presentes inventores aplican dos métodos para la evaluación de la afinidad de unión de anticuerpos monoclonales de ratón; análisis citométrico de flujo con tintes fluorescentes y medición radioactiva utilizando ¹²⁵I.

(1) Análisis de citometría de flujo (FACS)

10 Para investigar las afinidades de unión a célula de los cuatro anticuerpos, 39-2 y 39-10 (descritos en el documento WO2005/004912), 92-13 y 93-22, realizamos experimentos de citometría de flujo (FACS). Para análisis citométrico de flujo con fluorescencia indirecta, se incuban suspensiones de 5 x 10⁶ células con 10 µg/ml de Mab o IgG de ratón no inmunizado (Beckman Coulter) durante 30 min a 4° C. Después de lavar con PBS, se agrega 2 mg de IgG antiratón de cabra fluorescente (Alexa Fluor 488, Molecular Probes, Eugene, Oregon), y la suspensión celular se incubaba durante 30 min a 4° C para análisis mediante FACScan (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Para ensayos de inmunofluorescencia directa, las células se incuban con 2 mg de Mab Alexa488 en la presencia o ausencia de exceso de cantidad (100 mg) de Mab no marcados durante 30 min a 4° C y se someten a análisis mediante FACScan.

20 Con el fin de confirmar la expresión de FZD10 en estirpes celulares, realizamos RT-PCR. Para experimentos RT-PCR, se extraen ARN totales de estirpes celulares utilizando reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), y una alícuota de 3 mg de cada ARN total se transcribe en forma inversa. Se realiza amplificación PCR utilizando los cADN como plantillas con los siguientes cebadores: 5'-TATCGGGCTCTTCTGTGC-3' (SEQ ID NO: 9) y 5'-GACTGGCAGGGATCTCATA-3' (SEQ ID NO: 10) para FZD10 y 5'-TTAGCTGTGCTCGCGCTACT-3' (SEQ ID NO: 11) y 5'-TCACATGGTTCACACGGCAG- 3' (SEQ ID NO: 12) para β2-microglobulina (β2MG), el control interno.

25 Como se muestra en la Figura 1a, todos los cuatro Mab, 39-2, 39-10, 92-13 y 93-22 unidos a las cuatro estirpes celulares SS que expresan FZD10, SYO-1, YafuSS, HS-SY-2, y Fuji en una forma dependiente de dosis FZD10, pero no unido a dos estirpes celulares, 1973/99 y LoVo, en el que no se detecta transcripto de FZD10. La Tabla 1 adelante indica la correlación entre las intensidades de fluorescencia media relativa (MFI), de estos Mab y los niveles de expresión de FZD10 mostrados en la Figura 1b. Adicionalmente, particularmente, demostramos que los Mab 92-13 y 93-22 también se unen ale SNU-C5 transfectado con la construcción FZD10-myc/His, aunque no se detecta unión con células SNU-C5 transfectadas con el vector vacío (Figura 1c), que sugiere unión específica de aquellos Mab 92-13 y 93-22 contra la proteína FZD10.

Tabla 1. Unión de Mab anti-FZD10 en estirpes celulares SS humanas SYO-1, YaFuSS, HS-SY-II, Fuji, 1973/99 y la estirpe celular humana de cáncer de colon, LoVo.

	SYO-1	YaFuss	HS-SY-11	Fuji	1973/99	LoVo
39-2	17.6	11.6	9.4	7.1	5.5	1.1
39-10	18.4	11.8	9.9	6.9	4.9	1.0
92-13	4.7	3.0	3.0	1.3	0.9	1.0
93-22	3.3	2.7	2.4	1.1	1:0	1.1
El MFI de FZD10 se mide mediante citometría de flujo como se describió anteriormente.						

(2) Actividad de unión contra células de sangre normales

35 Para confirmar si se pueden aplicar aquellos anticuerpos para uso clínico, los presentes inventores examinan adicionalmente la actividad de unión de anticuerpos contra células de sangre normales. Para evaluar la actividad de unión no específica de los Mab contra células de sangre normales, los Mab marcados ¹²⁵I se incuban con 100 ml de sangre frescamente saludable. Después de incubación durante una hora a temperatura ambiente, las radioactividades del glóbulo celular se miden como se describió anteriormente.

La actividad de unión de los Mab 92-13 y 93-22 marcados ¹²⁵I contra glóbulos rojos humanos normales son indetectables en todos los tres donantes individuales, mientras que aquellos Mab 39-2 y 39-10 se detectan en todos los tres donantes individuales (Figura 1d). Estos resultados son consistentes con aquellos análisis FACS utilizando células mononucleares de sangre periférica humana (datos no mostrados), lo que sugiere aplicabilidad clínica de solo anticuerpos 92-13 y 93-22 con poca posibilidad de efectos adversos para pacientes SS debido a afinidad de unión muy específica para la molécula FZD10. Por lo tanto, nos enfocamos solo en anticuerpos 92-13 y 93-22 para análisis adicional.

(3) Análisis adicional

Adicionalmente, se realiza ensayo de unión utilizando Mab marcados ¹²⁵I (véase Ejemplo 1 (2)) para evaluar la afinidad de unión contra moléculas FZD10 en superficie celular. Para análisis radioactivo, 0.5 kBq (0.001 mg de anticuerpo) Mab marcados ¹²⁵I preparados en el Ejemplo 1 (2) se agregan a 100 ml de suspensión celular con varias cantidades de Mab idénticos no marcados. Después de incubación durante una hora a temperatura ambiente, la suspensión celular se centrifuga a 800 x g. Se retira el sobrenadante y se mide la radioactividad del glóbulo celular.

Los resultados muestran afinidad de unión mayor del anticuerpo 92-13 que el anticuerpo 93-22; aproximadamente 33 % de 92-13 unido a las células y aproximadamente 9 % del anticuerpo 93-22 unido a las células bajo la misma condición (Figura 1e). La cantidad del anticuerpo unido reducido como anticuerpos no marcados se agrega en una forma dependiente de dosis.

Realizamos posteriormente análisis de competición de unión de Mab 92-13 con 93-22 utilizando citometría de flujo. La unión celular de anticuerpos marcados Alexa488 se bloquea completamente mediante alta cantidad de anticuerpos no marcados (Figura 1f, ii e iii) entre sí, lo que sugiere que los Mab 92-13 y 93-22 se reconocen probablemente son muy similares o el mismo epítipo de FZD10. Estos hallazgos sugieren que estos Mab son capaces de reconocer específicamente FZD10 expresado en la superficie celular de células SS.

Ejemplo 3

Inmunohistoquímica

Para evaluar la especificidad de unión de 92-13 y 93-22 en tejidos humanos, realizamos análisis inmunohistoquímico utilizando secciones de tejido congelado. Las secciones de tejido de órganos humanos congelados de adulto normal (BioChain, Hayward, California) se fija con 4 % de paraformaldehído a 4° C durante 15 min, y se incuba con 5 mg/ml de Mab durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega Reactivo de Polímero ENVISION de ratón (DAKO) y se visualiza con sustrato de peroxidasa (Tetrahidrocloruro de 3, 3'-Diaminobenzidina).

Los resultados se muestran en la Figura 2. La Figura 2 muestra el análisis inmunohistoquímico en secciones de tejido congelado humano normal y SS sin anticuerpo (a, d, g, j, y m), 92-13 (b, e, h, k, y n) y 93-22 (c, f, i, l, y o). (a-c), sarcoma sinovial; (d-f), riñón; (g-i), hígado, (j-l), corazón; (m-o), cerebro. Esperadamente, observamos fuerte inmunoreactividad en FZD10 en el espécimen SS (Figura 2, a, b, y c) y placenta (datos no mostrados), pero no se detectan en normal riñón, corazón, cerebro y hígado (Figura 2, d-o), concordante con los resultados de northern blot y experimentos RT-PCR (Nagayama, S., et al. (2005). *Oncogene*, 24, 6201-6212.).

Ejemplo 4

Biodistribución de Mab anti-FZD 10 en modelo de xenoinjerto de ratones Balb/c

La distribución de 92-13 y 93-22 en modelo in vivo se examina en ratones BALB/c por medio de dos métodos independientes, formación de imágenes de radionúclido y formación de imágenes fluorescente.

(1) Formación de imágenes de radionúclido In vivo

Se realizan experimentos in vivo en instalaciones para animal de acuerdo con las directrices institucionales. Se inyectan subcutáneamente ratones BALB/cA Jcl-nu (hembra, 7 semanas de edad) (s.c.) con células neoplásicas SYO-1 (5 x 10⁶ células), en 0.1ml de PBS, en los flancos. Para estudios de biodistribución, los ratones con tumores completamente establecidos se les da 10kBq (0.5-1 mg) de Mab marcados ¹²⁵I y 10kBq (0.5-1 mg) de Mab marcados ¹¹¹In por medio de la vena de la cola. En 1, 24, 48 horas, a los animales se les practica la eutanasia y se miden el peso y radioactividad de los tejidos. La distribución se expresa como % de dosis inyectada /g de tejido para todas las muestras. Para biodistribución de formación de imagen óptica, se utilizan ratones que tienen tumor LoVo además de ratones con tumor SYO-1. Las células neoplásicas LoVo (1 x 10⁷ células) se inyectan s.c. en ratones BALB/cA Jcl-nu como se describió anteriormente. Cuando los tumores se establecen completamente, los ratones se someten al estudio de formación de imágenes.

Los resultados en la Figura 3a demuestra que la radioactividad de ^{111}In -92-13 asociada con la reducción de sangre de 35% de dosis inyectada por gramo (% de ID/g) en una hora post-inyección a 12 % después de 48 horas. Las radioactividades de ^{111}In -92-13 asociada hígado, riñón, intestino, bazo, páncreas, pulmón, corazón, estómago y músculo permanece constante o se reduce a través de la observación (Figura 3a). La radioactividad de ^{111}In -92-13 asociada con tumor acumulado a través del experimento, de 2% de D/g en una hora post-inyección a 11% de ID/g después de 48 horas. De otra parte, la Figura 3b demuestra que la radioactividad de 92-13 marcado ^{125}I asociada con tumor no aumenta significativamente aunque la radiactividad asociada con sangre es de 25 % en una hora a 7 % después de 48 horas y las radioactividades asociadas con otros órganos normales permanecen constantes. Los anticuerpos macados ^{125}I se degradan posiblemente dentro de la célula después de internalización. También se acumulan 93-22 marcados ^{111}In en tumor SYO-1 a 48 horas post-inyección (Figura 3c) y 93-22 marcados ^{125}I muestran pobre acumulación (Figura 3d), sugiere su internalización así como también 92-13.

(2) Formación de imágenes en fluorescencia in vivo

La formación de imágenes en fluorescencia in vivo se realiza con el Sistema de Formación de Imágenes IVIS™ 100 series (Xenogen, Alameda, CA). Se utiliza un filtro Cy5.5 optimizado para adquirir fluorescencia de Mab Alexa647 in vivo. Se inyectan ratones que tienen tumor SYO-1 20 mg de Mab marcados Alexa647 intraperitonealmente y se someten a formación de imágenes fluorescentes en diversos momentos de tiempo. Los ratones se alimentan con alimento que no contiene alfalfa durante cuatro días antes de inyectar los Mab con el fin de reducir la fluorescencia de fondo. Cuando se adquieren imágenes, los ratones se anestesian con 2 % de isoflurano (Abbott Laboratories) y se ponen en sistema IVIS. A los ratones se les practica la eutanasia en cuatro días después de inyección Mab, el tumor y los órganos principales se cortan, y se obtiene imagen de fluorescencia.

Como se muestra en la Figura 4a, se detecta una cantidad significativa de fluorescencia en la ubicación del tumor 24 horas después de la inyección. Se observa fluorescencia unida al tumor para ambos Mab, 92-13 y 93-22; las señales alcanzan un nivel máximo a aproximadamente 48 horas después de inyección, y pueden ser detectables en 96 horas después de la inyección. Los presentes inventores sacrifican estos ratones 120 horas post-inyección y se mide su intensidad de fluorescencia en el tumor y también órganos normales importantes (hígado, bazo, riñón, páncreas, colon) (Figuras 4b y 4c). Se observa la señal de fluorescencia muy fuerte en el tumor diseccionado, mientras no se detecta la señal de fluorescencia en órganos normales. Para validar la especificidad de unión, los presentes inventores generan xenoinjertos utilizando la estirpe celular negativa de antígeno, LoVo, en ratones sin pelo y los Mab marcados Alexa647 inyectados, se realiza análisis de formación de imagen fluorescente. En ratones que tienen LoVo, no se detecta fluorescencia en la ubicación del tumor (Figura 5a), ni en el tumor diseccionado u otros órganos (Figuras 5b y 5c). Estos resultados demuestran que estos Mab también son capaces de unirse específicamente a células neoplásicas que expresan FZD10 in vivo.

Ejemplo 5

Internalización de Mab anti-FZD10 en células positivas de antígeno

Para investigar el comportamiento molecular de estos Mab después de unión a las superficies celulares, su ubicación se traza utilizando el sistema de formación de imágenes in vitro.

Se colocan en placas células en portaobjetos de cámara de 8 pozos (Nalge Nunc International, Naperville, IL) en densidad de 5×10^4 células por pozo. Las células se incuban con Mab durante tres horas a 37°C en cámara de aire que contiene 5 % de CO_2 . Los Mab que se unen a la superficie celular se retiran mediante regulador de separación por ácido (0.1M Glicina, 500mM NaCl; pH 2.5) a 4°C durante 10 min y se neutralizan con 500 mM Tris (pH 7.5). Las células luego se fijan con 3.7 % de formaldehído durante 15 min a temperatura ambiente, y se permeabilizan mediante exposición a 0.2 % TritonX-100 durante 10 min, seguido por bloqueo con 3% de albúmina de suero bovino durante una hora a temperatura ambiente. Para detectar los Mab internalizados en la célula, las muestras se incuban con IgG anti-ratón de cabra marcados Alexa488 (dilución 1:700) durante una hora a temperatura ambiente. Los portaobjetos se montan con DAPI (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) y se analizan mediante ópticas confocales Leica TCS SP1.

Como se muestra en la Figura 6, los Mab 92-13 y 93-22 se incorporan eficientemente en el citosol de células SYO-1 y células YaFuSS en 3 horas después de la incubación de Mab con células mediante formación de imágenes de microscopio confocal detectadas utilizando IgG anti-ratón de cabra marcados Alexa488 (Figura 6, a-f). De otra parte, las señales de fluorescencia de estos Mab son fuertemente detectables en células LoVo sin expresión FZD10 (Figura 6, g-i), demuestra que la unión de Mab específicos a la superficie celular FZD10 induce la internalización de los anticuerpos.

Ejemplo 6

Citotoxicidad específica de los Mab

El 92-13 y 93-22 no tienen efecto en el crecimiento celular del tumor cuando se agrega directamente en la célula cultivada (datos no mostrados). Para estudios de terapia, los tumores SYO-1 se hacen crecer en ratones BALB/cA Jcl-nu de la misma forma como el Ejemplo 4. Los diámetros de los tumores se miden mediante calibradores y los volúmenes de tumor se determinan utilizando la siguiente fórmula; $0.5 \times (\text{diámetro grande}) \times (\text{diámetro pequeño})^2$ como se describió previamente (Nagayama, S., et al. (2005). Oncogene, 24, 6201-12.). Cuando los volúmenes de tumor alcanzan más de $0.4\text{-}2.8 \text{ cm}^3$, los ratones sin pelo Balb/c que tienen tumor subcutáneo SYO-1 se asignan aleatoriamente a los grupos de tratamiento y se reciben inyecciones intravenosas de 100 mCi de los Mab marcados ^{90}Y o Mab de control por medio de la vena de la cola. Los ratones se pesan se registran los diámetros de tumor.

La Figura 7 muestra que los volúmenes de tumor se reducen marcadamente inmediatamente después de tratamiento, casi las trazas dentro de una semana en todos los ratones. Cuando 50 mCi de ^{90}Y -DTPA-92-13 se les da a los ratones, los tumores de $> 1\text{cm}^3$ volúmenes se refractan dos semanas después de tratamiento aunque muestran reducción marcada del tamaño de tumor inmediatamente después de tratamiento. Los ratones muestran reducción temporal del peso (10~15 %), sin embargo, se recuperan en una semana y no se observan signos tóxicos visibles (datos no mostrados).

Ejemplo 7

Generación de Anticuerpos Quiméricos

Los anticuerpos quiméricos que corresponden a anticuerpos 92-13 y 93-22 de ratón, se generan ch92-13 y ch93-22 mediante el reemplazo de la secuencia de región variable de cada anticuerpo de ratón a la región constante humana IgG1 bajo el control del promotor CMV. Se extraen ARN totales de clones de hibridoma 92-13 y 93-22. Se sintetiza el cADN del ARN total utilizando el Equipo GeneRacer™ (Invitrogen). Las secuencias de las regiones variables de anticuerpos monoclonales se amplifican utilizando el cebador delantero (Cebador 5' GeneRacer™) y reverse primer; CH1 (IgG2a); 5'-AATTTTCTTGCCACCTTGGTG- 3' (SEQ ID NO: 3) para la cadena pesada y CL1 (kappa); 5'-CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 4) para la cadena ligera. Se secuencian los productos PCR y se determinan las secuencias que codifican la región variable m92-13 y m93-22.

Como resultado, la secuencia de aminoácidos de las regiones variables de cadena H Ig de ratón y las regiones variables de cadena L se determinan como sigue:

92-13, región variable de cadena H:

MKCSWVIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVKPGASVKLSCTASGFNINDTYMH
WVKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSED

AVYYCARGARGSRFAYWGQGLTVTVSA (SEQ ID NO: 13) codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 14, y 92-13, la región variable de cadena L:

MSVPTQVLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWY
QQKQKSPQLLVYVATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINLSQSEDFGSYYCQHF WGTPYTFGGGTKL (SEQ ID NO: 21) codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 22; y 93-22, región variable de cadena H:

MGWSRIFLFLLSITAGVHCQVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNW
VKQRPGQGLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSVDS
 AVYFCARGGNYGWFAYWGQGLTVTVSAGS (SEQ ID NO: 29) codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 30, y 93-22, la región variable de cadena L:

METDTLLLWVLLLWGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSY
MHWYQQKPGQPPLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYY CQHSRELYTFGGGTKLGS (SEQ ID NO: 37) codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 38. Lo subrayado indica las señales de secuencia.

Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de la cadena H y cadena L de anticuerpos de ratón monoclonales 92-13, 93-22 y 39-10 se determinan como sigue:

92-13, cadena H: SEQ ID NO: 58 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 57);

92-13, cadena L: SEQ ID NO: 60 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 59);

93-22, cadena H: SEQ ID NO: 62 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 61);

93-22, cadena L: SEQ ID NO: 64 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 63);

39-10, cadena H: SEQ ID NO: 66 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 65);

39-10, cadena L: SEQ ID NO: 68 (codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 67).

De acuerdo con la secuencia determinada, los cebadores específicos para la región variable m92-13 se designan: 5'-AATAGCGGCCGCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTT-3' (SEQ ID NO: 5) y 5'-AATAGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCC-3' (SEQ ID NO: 6) para la cadena pesada y 5'-AATAGCGGCCGCACCATGAGTGTGCCCACTCAGG-3' (SEQ ID NO: 7) y 5'-TTCCAGCTTGGTCCCCC-3' (SEQ ID NO: 8) para la cadena ligera. También, los cebadores específicos para la región variable m93-22 se designan, 5'-AATAGCGGCCGCACCATGGGATGGAGCCGGATCTTT-3' (SEQ ID NO: 53) y 5'-AATAGGATCCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCCTT-3' (SEQ ID NO: 54) para la cadena pesada y 5'-AATAGCGGCCGCACCATGGAGACAGACACTCCT-3' (SEQ ID NO: 55) y 5'-AATAGGATCCCAGCTTGGTCCCCCTCCGAACGT-3' (SEQ ID NO: 56) para la cadena ligera. Para construir el vector de expresión para anticuerpos quiméricos, se preparan dos vectores de casete. El fragmento de ADN que codifica el IgG1 humano (CH1-CH3) se inserta en pQCXIH (Clontech) (pQCXCHIH) y el fragmento de ADN que codifica el Igk humano (CL1) se inserta en pQCXIP (pQCXCLIP). Para obtener fragmentos de ADN que codifican el IgG1 humano o el Igk humano, la colección de región constante humana se prepara utilizando cADN del PBMC humano (células mononucleares de sangre periférica) mediante el método reportado (Liu, A.Y. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.84, 3439-43, 1987; Reff, M.E. et al., Blood, Vol.83, No.2, 435-45, 1994). Los ADN que codifican la región variable de m92-13 y m93-22 de cadena pesada y de cadena ligera se amplifican por PCR, se secuencian y se subclonan en pQCXCHIH y pQCXCLIP respectivamente utilizando el sitio NotI y BamHI. Estos vectores se co-transfectan en células CHO. Las células transfectadas se cultivan en medio F-12 que contiene 500 mg/ml de Higromicina y 10 mg/ml de Puromicina. Cuando las células que crecen sub-confluentemente, el medio se intercambia con medio libre de suero (CHO-S-SFM II; GIBCO) y el anticuerpo quimérico se purifica del sobrenadante de células cultivadas utilizando columna de afinidad de proteína A (GE Amersham) y se secuencian. La secuencia de cadena pesada del anticuerpo quimérico ch92-13 comprende SEQ ID NO: 46 codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 45; y la secuencia de cadena ligera de anticuerpo quimérico ch92-13 comprende SEQ ID NO: 48 codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 47. La secuencia de cadena pesada de anticuerpo quimérico ch93-22 comprende SEQ ID NO: 49 codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 50; y la secuencia de cadena ligera de anticuerpo quimérico ch93-22 comprende SEQ ID NO: 52 codificado por la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 51.

30 Ejemplo 8

Actividad de unión de Anticuerpos Quiméricos

Se determinan las actividades de citotoxicidad dependientes de anticuerpo (ADCC) inducidas por 92-13 y 93-22 quimérica utilizando actividad LDH como se describió previamente (Nagayama, S., et al. (2005). Oncogene, 24, 6201-6212.). Se aíslan células efectoras frescas de sangre periférica heparinizada de un donante saludable por Ficoll-Plaque (Amersham Bioscience). Las células efectoras (E) y las células objetivo (T) (cada una, 5×10^3 /pozo) se co-incuban durante 6 h a 37° C en cuadruplicado en diversas relaciones E:T, junto con 92-13 quimérico, 93-22 quimérico o IgG humano no inmunizado, en 0.1 ml de RPMI 1640 libre de rojo fenol complementado con 5 % de FBS en una placa de 96 pozos. El LDH liberado en el sobrenadante de cultivo se determina mediante absorbancia a 490nm. El porcentaje de citotoxicidad específica se calcula de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

40 Con referencia a la actividad efectora, el 92-13 y 93-22 quimérico que induce ADCC específicamente a las células SYO-1 que sobreexpresan FZD10 (Figura 8, a y c), pero no a las células LoVo negativas FZD10 (Figura 8, b y d). Particularmente, el 92-13 quimérico muestra mayor inducción de citotoxicidad cuando se compara con el 93-22 quimérico, sin embargo, su actividad depende del donante de célula efectora, posiblemente provocado por polimorfismo del receptor Fc.

45 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> OncoTerapia Science, Inc.

The University of Tokyo

National University Corporation Gunma University

<120> Anticuerpos monoclonales dirigidos a anticuerpos quiméricos y de tumor para FZD10 y usos de los mismos

50 <130> PH-2818PCT

ES 2 405 618 T3

<150> US 60/815,257

<151> 2006-06-21

<160> 68

<170> PatentIn version 3.1

5 <210> 1

<211> 2811

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
acacgtcaa cgccagcatg cagcgcccgg gccccgcct gtggctggtc ctgcaggtga 60
tgggctcgtg cgccgccatc agctccatgg acatggagcg ccogggcgac ggcaaatgcc 120
agcccatcga gatcccgatg tgcaaggaca tcggtacaaa catgactcgt atgccaacc 180
tgatgggcca cgagaaccag cgcgaggcag ccatccagt gcacgagttc gcgccgctgg 240
tggagtacgg ctgccacggc cacctccgct tcttctgtg ctgctgtac gcgccgatgt 300
gcaccgagca ggtctctacc cccatccccg cctgccgggt catgtgcgag caggcccggc 360
tcaagtgtc cccgattatg gagcagttca acttcaagt gcccgactcc ctggactgcc 420
ggaaactccc caacaagaac gacccaact acctgtgcat ggaggcgccc aacaacggct 480
cggacgagcc caccgggggc tcgggcctgt tcccgccgct gttccggccg cagcggcccc 540
acagcgcgca ggagcaccgg ctgaaggacg ggggccccgg gcgcggcggc tgcgacaacc 600
cgggcaagtt ccaccacgtg gagaagagcg cgtcgtgcgc gccgctctgc acgcccggcg 660
tggacgtgta ctggagccgc gaggacaagc gcttcgcagt ggtctggctg gccatctggg 720
cgggtcgtgt cttctctcc agcgccttca ccgtgctcac ctctctcacc gacccggccc 780
gcttccgcta ccccgagcgc cccatcatct tcctctccat gtgctactgc gtctactccg 840
```

10

ES 2 405 618 T3

tgggctacct catccgctc ttcgccggcg ccgagagcat cgcctgagac cgggacagcg 900
 gccagctcta tgcatccag gagggactgg agagcaccgg ctgcacgctg gtcttcctgg 960
 tccttacta ctccggcatg gccagctcgc tgtggtgggt ggtcctcag ctcacctgtt 1020
 tcctggccgc cgcaagaag tggggccacg aggccatcga agccaacagc agctacttcc 1080
 acctggcagc ctgggccatc ccggcgggtga agaccatcct gatcctggtc atgcgcaggg 1140
 tggcggggga cgagctcacc ggggtctgct acgtgggcag catggacgtc aacgcgctca 1200
 ccggcttcgt gctcattcc ctggcctgct acctggatc cggcacgtcc ttcactctct 1260
 cgggcttcgt ggcctgttc cacatccgga gggatgatga gacgggcggc gagaacacgg 1320
 acaagctgga gaagctcatg gtgcgtatcg ggctcttctc tgtgctgtac acctgcccgg 1380
 ccacctgtgt gatcgcctgc tacttttacg aacgcctcaa catggattac tggaaatcc 1440
 tggcggcgca gcacaagtgc aaaatgaaca accagactaa aacgctggac tgcctgatgg 1500
 ccgcctccat ccccgccgtg gagatcttca tggatgaagat ctttatgctg ctggtggtgg 1560
 ggatcaccag cgggatgtgg atttgacct ccaagactct gcagtcctgg cagcaggtgt 1620
 gcagccgtag gttaaagaag aagagccgga gaaaaccggc cagcgtgatc accagcggtg 1680
 ggatttaca aaaagcccag catcccaga aaactacca cgggaaatat gagatccctg 1740
 cccagtcgcc cacctgcgtg tgaacagggc tggagggag ggcacagggg cggccggagc 1800
 taagatgtgg tgcctttctt ggttgtgttt ttctttcttc ttcttctttt ttttttttt 1860
 ataaaagcaa aagagaaata cataaaaaag tgtttaccct gaaattcagg atgctgtgat 1920
 aactgaaag gaaaatgta cttaaagggt tttgtttgt tttggtttc cagcgaaggg 1980
 aagctcctcc agtgaagtag cctcttgtgt aactaatttg tggtaaagta gttgattcag 2040
 ccctcagaag aaaacttttg tttagagccc tccgtaaaata tacatctgtg tatttgagtt 2100
 ggctttgcta cccatttaca aataagagga cagataactg ctttgcaaat tcaagacct 2160
 cccctgggtt acaaatgag ccatcccag ggcccacccc caggaaggcc acagtgtctg 2220
 cggcatccc tcagaggaa agacaggacc cggggccgc ctacacccc agtggatttg 2280
 gagttgctta aaatagactc tggccttcac caatagtctc tctgcaagac agaaacctcc 2340
 atcaaacctc acatttgtga actcaaacga tgtgcaatac attttttct ctttccttga 2400
 aaataaaaag agaacaagt attttctat atataaagac acaaaaagaa atctcctaac 2460
 aaaagaacta agaggcccag cctcagaaa cccttcagt ctacattttg tggcttttta 2520
 atggaacca agccaatgtt atagacgttt ggactgattt gtgaaagga gggggaaga 2580
 gggagaagga tcattcaaaa gtaccctaaa gggcttattg actctttcta ttgttaaca 2640
 aatgatttcc acaaacagat caggaagcac taggttgca gagacacttt gtctagtgt 2700
 ttctcttcac agtgccagga aagagtgggt tctgcgtgtg tatatttga atatagata 2760
 ttttcatgc tccactattt tattaaaaat aaaatatgtt ctttaaaaa a 2811

<210> 2

ES 2 405 618 T3

<211> 581

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

5

ES 2 405 618 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Ala Gly Lys Lys Trp Gly His Glu Ala Ile Glu Ala Asn Ser Ser

<211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Un cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR

<400> 3

aattttcttg tccacctgg tg 22

<210> 4

<211> 26

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR

<400> 4

15 ctaacactca ttctgttga agctct 26

<210> 5

<211> 38

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR

<400> 5

aatagcggcc gcacatgaa atgcagctgg gttatctt 38

<210> 6

25 <211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR

30 <400> 6

aatagctagc tgcagagaca gtgaccagag tcc 33

<210> 7

<211> 34

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR

<400> 7

aatagcggcc gcaccatgag tgtgccact cagg 34

<210> 8

10 <211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR

15 <400> 8

ttccagcttg gtccccc 18

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR

<400> 9

tatcgggctc ttctctgtgc 20

25 <210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

30 <223> Una secuencia de cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR

<400> 10

ES 2 405 618 T3

gactgggcag ggatctcata 20
<210> 11
<211> 20
<212> ADN
5 <213> Artificial
<220>
<223> Una secuencia de cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR
<400> 11
ttagctgtgc tcgcgtact 20
10 <210> 12
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
15 <223> Una secuencia de cebador artificialmente sintetizado para RT-PCR
<400> 12
tcacatggtt cacacggcag 20
<210> 13
<211> 137
20 <212> PRT
<213> Ratón
<400> 13

ES 2 405 618 T3

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Asn Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Arg Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 130 135

<210> 14

<211> 411

<212> ADN

5 <213> Ratón

<400> 14

atgaaatgca gctgggttat cttcttctcg atggcagtgg ttacaggggt caattcagag 60
 gttcagctgc agcagtctgg ggcagagctt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
 tgcacagctt ctggcttcaa cattaacgac acctatatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
 gaacagggcc tggagtggat tggaggatt gatcctgcga atgtaatac taaatatgac 240
 ccgaagtcc agggcaaggc cactataaca gcagacacat cctccaacac agcctacctg 300
 cagctcagca gcctgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctag aggagcacgg 360
 gggagtagat ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 411

<210> 15

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Ratón

<400> 15

Ile Asn Asp Thr Tyr Met His
1 5

<210> 16

5 <211> 21

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 16

attaacgaca cctatgca c 21

10 <210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 17

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

<210> 18

<211> 36

<212> ADN

<213> Ratón

20 <400> 18

aggattgatc ctgcgaatgg taatactaaa tatgac 36

<210> 19

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Ratón

<400> 19

Gly Ser Arg Phe Ala Tyr
1 5

<210> 20

ES 2 405 618 T3

<211> 18

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 20

5 gggagtagat ttgcttac 18

<210> 21

<211> 124

<212> PRT

<213> Ratón

10 <400> 21

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120

<210> 22

<211> 372

<212> ADN

15 <213> Ratón

<400> 22

ES 2 405 618 T3

```

atgagtgtgc ccaactcaggt cctgggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt    60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc    120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catgggatca gcagaaacag    180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatggt gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca    240
aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct    300
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat tttggggta ctccgtacac gttcggaggg    360
gggaccaagc tg                                                              372

```

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Ratón

<400> 23

```

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala
1           5           10

```

<210> 24

<211> 33

10 <212> ADN

<213> Ratón

<400> 24

```

cgagcaagtg agaatattta cagtaattta gca                                33

```

<210> 25

15 <211> 7

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 25

```

Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1           .5

```

20 <210> 26

<211> 27

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 26 27

gtctatgttg caacaaactt agcagat 27

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Ratón

<400> 27

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr
1 . 5

<210> 28

<211> 24

10 <212> ADN

<213> Ratón

<400> 28

caacattttt ggggtactcc gtac 24

<210> 29

15 <211> 139

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 29

ES 2 405 618 T3

Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly
1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35 40 45

Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

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

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Gly Ser
130 135

<210> 30

<211> 417

<212> ADN

5 <213> Ratón

<400> 30

atgggatgga gccgatctt tctcttcctc ctgtcaataa ctgcaggtgt ccattgccag 60
gtccagctgc agcagctctgg acctgagctg gtgaagcctg ggcctcagt gaagattcc 120
tgcaaagctt ctggctacgc attcagtage tcttgatga actgggtgaa gcagaggcct 180
ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tctcctggag atggagatac taactacaat 240
gggaagtca agggcaaggc cacctgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
caactcagca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tctgtgcaag aggggtaac 360
tacggctggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc aggatcc 417

<210> 31

10 <211> 5

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 31

Ser Ser Trp Met Asn
1 5

5 <210> 32

<211> 18

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 32

10 agtagctctt ggatgaac 18

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> Ratón

15 <400> 33

Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
1 5 10

<210> 34

<211> 36

<212> ADN

20 <213> Ratón

<400> 34

cggattatc ctggagatgg agatactaac tacaat 36

<210> 35

<211> 9

25 <212> PRT

<213> Ratón

<400> 35

Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5

ES 2 405 618 T3

<210> 36

<211> 27

<212> ADN

<213> Ratón

5 <400> 36

gggggtaact acggctgggtt tgcttac 27

<210> 37

<211> 129

<212> PRT

10 <213> Ratón

<400> 37

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gly
115 120 125

Ser

<210> 38

15 <211> 456

<212> ADN

ES 2 405 618 T3

<213> Ratón

<400> 38

```

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt    60
gacattgtgc tgacacagtc tectgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc    120
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac    180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc etcatctatc ttgcatcaa cctagaatct    240
ggggtccttg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caacatccat    300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gctgtacacg    360
ttcggagggg ggaccaagct gggatccgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc    420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatct                                456

```

<210> 39

5 <211> 15

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 39

```

Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1      .      5              10              15

```

10 <210> 40

<211> 45

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 40

15 agggccagca aaagtgtcag tacatctggc tatagttata tgcac 45

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Ratón

20 <400> 41

```

Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1      .      5

```

<210> 42

<211> 21

ES 2 405 618 T3

<212> ADN

<213> Ratón

<400> 42 21

cttgcaccca acctagaatc t 21

5 <210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Ratón

<400> 43

Gln His Ser Arg Glu Leu Tyr
1 5

10

<210> 44

<211> 21

<212> ADN

<213> Ratón

15 <400> 44

cagcacagta gggagctgta c 21

<210> 45

<211> 1404

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena H del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 45

atgaaatgca gctgggttat cttcttcctg atggcagtgg ttacaggggt caattcagag 60

ES 2 405 618 T3

gttcagctgc agcagctctgg ggcagagctt gtgaagccag gggcctcagt caagttgtcc 120
 tgcacagctt ctggcttcaa cattaacgac acctatatgc actgggtgaa gcagaggcct 180
 gaacagggcc tggagtggat tggaggatt gatcctgcga atggtataac taaatatgac 240
 ccgaagtcc agggcaaggc cactataaca gcagacacat cctccaacac agcctacctg 300
 cagctcagca gcttgacatc tgaggacact gccgtctatt actgtgctag aggagcacgg 360
 gggagtagat ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc agctagcacc 420
 aagggccat cggctctccc cctggcacc tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcttggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtctc aggactctac 600
 tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaâ 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccagggtca gcttgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ccccggttaa atga 1404

<210> 46

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena H del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 46

ES 2 405 618 T3

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
 1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
 35 40 45

Asn Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
 65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Arg Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 130 135 140

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val
 165 170 175

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

ES 2 405 618 T3

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His
 210 215 220

Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 225 230 235 240

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300

His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro

ES 2 405 618 T3

405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
420 425 430

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
435 440 445

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 47

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena L del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 47

```

atgagtgtgc cactcaggt cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt    60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc    120
atcacatgtc gagcaagtga gaatatttac agtaatttag catggtatca gcagaaacag    180
ggaaaatctc ctcagctcct ggtctatggt gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca    240
aggttcagtg gcagtgatc aggcacacag tattccctca agatcaacag cctgcagtct    300
gaagattttg ggagttatta ctgtcaacat ttttgggta ctccgtacac gttcggaggg    360
gggaccaagc tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca    420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gctgctgaa taacttctat    480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag    540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgaca    600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccacagggc    660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                    705

```

10 <210> 48

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 405 618 T3

<223> Una secuencia de cadena L del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 48

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

ES 2 405 618 T3

165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

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

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230

<210> 49

<211> 1398

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena H del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 49

atgggatgga gccgatctt tctcttcctc ctgtcaataa ctgcaggtgt ccattgccag 60

gtccagctgc agcagctctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc 120

tgcaaagctt ctggctacgc attcagtagc tcttgatga actgggtgaa gcagaggcct 180

ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tatcctggag atggagatac taactacaat 240

gggaagtca agggcaaggc cacaactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tctgtgcaag agggggtaac 360

tacggctggt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc aggatccgcc 420

tccaccaagg gcccatcggg cttcccctg gcgcctctgt ccaggagcac ctccgagagc 480

acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttcccog aaccggtgac ggtgtcgtgg 540

aactcaggcg ctctgaccag cggcgtgcac accttcccgg ctgtcctaca gtccctcagga 600

ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca acttcggcac ccagacctac 660

acctgcaacg taaatcacia gccacgaac accaaggtgg acaagacagt tgagcgcaa 720

ES 2 405 618 T3

tgttgtgtcg agtgcccacc gtgcccagca ccacctgtgg caggaccgtc agtcttcctc 780
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacgtgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccccag gtccagtca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttc tctacagcaa gtcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca ttaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatga 1398

<210> 50

<211> 465

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena H del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 50

Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly
 1 5 10 15

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

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45

Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn

ES 2 405 618 T3

Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 290 295 300

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 305 310 315 320

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 325 330 335

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 340 345 350

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 355 360 365

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 370 375 380

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 385 390 395 400

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 405 410 415

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 420 425 430

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 435 440 445

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 450 455 460

Lys
 465

<210> 51

<211> 720

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena L del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 51

ES 2 405 618 T3

atggagacag acacactcct gttatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
gacattgtgc tgacacagtc tctgcttcc ttagctgtat ctctggggca gagggccacc 120
atctcatgca gggccagcaa aagtgtcagt acatctggct atagtatat gcactggtac 180
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc ttgcatcaa cctagaatct 240
ggggtccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcacct caacatccat 300
cctgtggagg aggaggatgc tgcaacctat tactgtcagc acagtaggga gctgtacacg 360
ttcggagggg ggaccaagct gggatccgaa atcaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 420
ttcatctcc ccgcatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctcaa 540
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgtgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

<210> 52

<211> 239

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Una secuencia de cadena L del anti-REG4 anticuerpo quimérico anti-REG4 con secuencia de señal.

<400> 52

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
35 40 45

ES 2 405 618 T3

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Gly
115 120 125

Ser Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 53

<211> 36

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR

<400> 53

aatagcggcc gcaccatggg atggagccgg atcttt 36

10 <210> 54

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR
 <400> 54
 aataggatcc tgcagagaca gtgaccagag tccctt 36
 <210> 55
 <211> 35
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR
 <400> 55
 15 aatagcggcc gcacatgga gacagacaca ctctt 35
 <210> 56
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Un cebador artificialmente sintetizado para PCR
 <400> 56
 aataggatcc cagcttggtc cccctccga acgt 34
 <210> 57
 25 <211> 1404
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> polipéptido sintético: 92-13 cadena H
 30 <220>
 <221> CDS

ES 2 405 618 T3

<222> (1).. (1404)

<223>

<400> 57

atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca gtg gtt aca ggg	48
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly	
1 5 10 15	
gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gca gag ctt gtg aag	96
Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys	
20 25 30	
cca ggg gcc tca gtc aag ttg tcc tgc aca gct tct ggc ttc aac att	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile	
35 40 45	
aac gac acc tat atg cac tgg gtg aag cag agg cct gaa cag ggc ctg	192
Asn Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga agg att gat cct gcg aat ggt aat act aaa tat gac	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp	
65 70 75 80	
ccg aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca tcc tcc aac	288
Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn	
85 90 95	
aca gcc tac ctg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gcc gtc	336
Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val	
100 105 110	
tat tac tgt gct aga gga gca cgg ggg agt aga ttt gct tac tgg ggc	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Arg Phe Ala Tyr Trp Gly	
115 120 125	
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gcc aaa aca aca gcc cca tcg	432
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser	
130 135 140	
gtc tat cca ctg gcc cct gtg tgt gga gat aca act ggc tcc tcg gtg	480
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val	
145 150 155 160	
act cta gga tgc ctg gtc aag ggt tat ttc cct gag cca gtg acc ttg	528
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu	
165 170 175	
acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agt ggt gtg cac acc ttc cca gct	576
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
180 185 190	

ES 2 405 618 T3

gtc ctg cag tct gac ctc tac acc ctc agc agc tca gtg act gta acc Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr 195 200 205	624
tcg agc acc tgg ccc agc cag tcc atc acc tgc aat gtg gcc cac ccg Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro 210 215 220	672
gca agc agc acc aag gtg gac aag aaa att gag ccc aga ggg ccc aca Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr 225 230 235 240	720
atc aag ccc tgt cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac ctc ttg ggt Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly 245 250 255	768
gga cca tcc gtc ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat gta ctc atg Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met 260 265 270	816
atc tcc ctg agc ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gtg gat gtg agc gag Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu 275 280 285	864
gat gac cca gat gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac gtg gaa gta Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val 290 295 300	912
cac aca gct cag aca caa acc cat aga gag gat tac aac agt act ctc His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu 305 310 315 320	960
cgg gtg gtc agt gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg atg agt ggc Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly 325 330 335	1008
aag gag ttc aaa tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca gcg ccc atc Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile 340 345 350	1056
gag aga acc atc tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct cca cag gta Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val 355 360 365	1104
tat gtc ttg cct cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa cag gtc act Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr 370 375 380	1152
ctg acc tgc atg gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att tac gtg gag Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu 385 390 395 400	1200
tgg acc aac aac ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac act gaa cca Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro 405 410 415	1248
gtc ctg gac tct gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag ctg aga gtg Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val 420 425 430	1296
gaa aag aag aac tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt tca gtg gtc Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val 435 440 445	1344
cac gag ggt ctg cac aat cac cac acg act aag agc ttc tcc cgg act His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr 450 455 460	1392
ccg ggt aaa tga Pro Gly Lys 465	1404

ES 2 405 618 T3

<210> 58

<211> 467

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> polipéptido sintético: 92-13 cadena H

<400> 58

Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Asn Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

ES 2 405 618 T3

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Ala Arg Gly Ser Arg Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
 130 135 140

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
 145 150 155 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
 165 170 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
 180 185 190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
 195 200 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
 210 215 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
 225 230 235 240

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
 245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
 260 265 270

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
 275 280 285

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
 290 295 300

ES 2 405 618 T3

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
325 330 335

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val
355 360 365

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
370 375 380

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
385 390 395 400

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
420 425 430

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
435 440 445

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 59

<211> 705

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 92-13 cadena L

<220>

<221> CDS

10 <222> (1)..(705)

<223>

<400> 59

ES 2 405 618 T3

atg agt gtg ccc act cag gtc ctg ggg ttg ctg ctg ctg tgg ctt aca 48
 Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
 1 5 10 15

gat gcc aga tgt gac atc cag atg act cag tct cca gcc tcc cta tct 96
 Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
 20 25 30

gta tct gtg gga gaa act gtc acc atc aca tgt cga gca agt gag aat 144
 Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45

att tac agt aat tta gca tgg tat cag cag aaa cag gga aaa tct cct 192
 Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
 50 55 60

cag ctc ctg gtc tat gtt gca aca aac tta gca gat ggt gtg cca tca 240
 Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
 65 70 75 80

agg ttc agt ggc agt gga tca ggc aca cag tat tcc ctc aag atc aac 288
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
 85 90 95

agc ctg cag tct gaa gat ttt ggg agt tat tac tgt caa cat ttt tgg 336
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
 100 105 110

ggt act ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 384
 Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125

gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc agt gag cag 432
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
 130 135 140

tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg aac aac ttc tac 480
 Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
 145 150 155 160

ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc agt gaa cga caa 528
 Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
 165 170 175

aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc aaa gac agc acc 576
 Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 180 185 190

tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac gag tat gaa cga 624
 Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
 195 200 205

cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca tca act tca ccc 672
 His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
 210 215 220

att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt tag 705
 Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 60

<211> 234

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 405 618 T3

<223> polipéptido sintético: 92-13 cadena L

<400> 60

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

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Val Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp
100 105 110

Gly Thr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

115

120

125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210 215 220

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

5 <210> 61

<211> 1404

<212> ADN

ES 2 405 618 T3

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 93-22 cadena H

<220>

5 <221> CDS

<222> (1)..(1404)

<223>

<400> 61

```
atg gga tgg agc cgg atc ttt ctc ttc ctc ctg tca ata act gca ggt      48
Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly
1           5           10           15
```

```
gtc cat tgc cag gtc cag ctg cag cag tct gga cct gag ctg gtg aag      96
Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
          20           25           30
```

ES 2 405 618 T3

cct ggg gcc tca gtg aag att tcc tgc aaa gct tct ggc tac gca ttc	144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe	
35 40 45	
agt agc tct tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga cag ggt ctt	192
Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu	
50 55 60	
gag tgg att gga cgg att tat cct gga gat gga gat act aac tac aat	240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn	
65 70 75 80	
ggg aag ttc aag ggc aag gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc	288
Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser	
85 90 95	
aca gcc tac atg caa ctc agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc	336
Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val	
100 105 110	
tat ttc tgt gca aga ggg ggt aac tac ggc tgg ttt gct tac tgg ggc	384
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly	
115 120 125	
caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca gcc aaa aca aca gcc cca tcg	432
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser	
130 135 140	
gtc tat cca ctg gcc cct gtg tgt gga gat aca act ggc tcc tcg gtg	480
Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val	
145 150 155 160	
act cta gga tgc ctg gtc aag ggt tat ttc cct gag cca gtg acc ttg	528
Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu	
165 170 175	
acc tgg aac tct gga tcc ctg tcc agt ggt gtg cac acc ttc cca gct	576
Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
180 185 190	
gtc ctg cag tct gac ctc tac acc ctc agc agc tca gtg act gta acc	624
Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr	
195 200 205	
tcg agc acc tgg ccc agc cag tcc atc acc tgc aat gtg gcc cac ccg	672
Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro	
210 215 220	
gca agc agc acc aag gtg gac aag aaa att gag ccc aga ggg ccc aca	720
Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr	
225 230 235 240	
atc aag ccc tgt cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac ctc ttg ggt	768

ES 2 405 618 T3

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly	
245 250 255	
gga cca tcc gtc ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat gta ctc atg	816
Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met	
260 265 270	
atc tcc ctg agc ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gat gtg agc gag	864
Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu	
275 280 285	
gat gac cca gat gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac gtg gaa gta	912
Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val	
290 295 300	
cac aca gct cag aca caa acc cat aga gag gat tac aac agt act ctc	960
His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu	
305 310 315 320	
cgg gtg gtc agt gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg atg agt ggc	1008
Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly	
325 330 335	
aag gag ttc aaa tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca gcg ccc atc	1056
Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile	
340 345 350	
gag aga acc atc tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct cca cag gta	1104
Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val	
355 360 365	
tat gtc ttg cct cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa cag gtc act	1152
Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr	
370 375 380	
ctg acc tgc atg gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att tac gtg gag	1200
Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu	
385 390 395 400	
tgg acc aac aac ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac act gaa cca	1248
Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro	
405 410 415	
gtc ctg gac tct gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag ctg aga gtg	1296
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val	
420 425 430	
gaa aag aag aac tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt tca gtg gtc	1344
Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val	
435 440 445	
cac gag ggt ctg cac aat cac cac acg act aag agc ttc tcc cgg act	1392
His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr	
450 455 460	
ccg ggt aaa tga	1404
Pro Gly Lys	
465	

<210> 62

<211> 467

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 93-22 cadena H

ES 2 405 618 T3

<400> 62

Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
 35 40 45
 Ser Ser Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 115 120 125
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
 130 135 140

ES 2 405 618 T3

Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val
145 150 155 160

Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu
165 170 175

Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala
180 185 190

Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr
195 200 205

Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro
210 215 220

Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr
225 230 235 240

Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly
245 250 255

Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met
260 265 270

Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu
275 280 285

Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val
290 295 300

His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu
305 310 315 320

Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly
325 330 335

Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile
340 345 350

Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val

ES 2 405 618 T3

355 360 365

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 370 375 380

Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 385 390 395 400

Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 405 410 415

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 420 425 430

Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 435 440 445

His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 450 455 460

<210> 63

<211> 714

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 93-22 cadena L

<220>

<221> CDS

10 <222> (1).. (714)

<223>.

<400> 63

atg gag aca gac aca ctc ctg tta tgg gta ctg ctg ctc tgg gtt cca 48
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

ggt tcc act ggt gac att gtg ctg aca cag tct cct gct tcc tta gct 96
 Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

ES 2 405 618 T3

gta tct ctg ggg cag agg gcc acc atc tca tgc agg gcc agc aaa agt 144
 Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45

gtc agt aca tct ggc tat agt tat atg cac tgg tac caa cag aaa cca 192
 Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat ctt gca tcc aac cta gaa tct 240
 Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80

ggg gtc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc 288
 Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

ctc aac atc cat cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt 336
 Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

cag cac agt agg gag ctg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa 384
 Gln His Ser Arg Glu Leu Tyr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

ata aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca tcc 432
 Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg aac 480
 Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
 145 150 155 160

aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc agt 528
 Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
 165 170 175

gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc aaa 576
 Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac gag 624
 Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
 195 200 205

tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca tca 672
 Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
 210 215 220

act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt tag 714
 Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 64

<211> 237

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 93-22 cadena L

<400> 64

ES 2 405 618 T3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
 20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser
 35 40 45

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
 100 105 110

Gln His Ser Arg Glu Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
 115 120 125

Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser
 130 135 140

Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn
 145 150 155 160

Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser
 165 170 175

Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys
 180 185 190

Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu
 195 200 205

Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser
 210 215 220

Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

- <210> 65
- <211> 1395
- 5 <212> ADN
- <213> Artificial
- <220>

ES 2 405 618 T3

<223> polipéptido sintético: 39-10 cadena H

<220>

<221> CDS

<222> (1).. (1395)

5 <223>

<400> 65

atg gat tgg ctg tgg aac ttg cta ttc ctg atg gca gct gcc caa agt	48
Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser	
1 5 10 15	
atc caa gca cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag	96
Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys	
20 25 30	
cct gga gag aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc	144
Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe	
35 40 45	
aca aac tat gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta	192
Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu	
50 55 60	
aag tgg atg ggc tgg ata aac acc aac act gga gag cca aca tat gct	240
Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala	
65 70 75 80	
gaa gag ttc aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc	288
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser	

ES 2 405 618 T3

	85	90	95	
act gcc tat ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca				336
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr	100	105	110	
tat ttc tgt gca aga ggg ggg tac ggg gac tac tgg ggc caa ggc acc				384
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	115	120	125	
act ctc aca gtc tcc tca gcc aaa aca aca gcc cca tcg gtc tat cca				432
Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro	130	135	140	
ctg gcc cct gtg tgt gga gat aca act ggc tcc tcg gtg act cta gga				480
Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly	145	150	155	160
tgc ctg gtc aag ggt tat ttc cct gag cca gtg acc ttg acc tgg aac				528
Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn	165	170	175	
tct gga tcc ctg tcc agt ggt gtg cac acc ttc cca gct gtc ctg cag				576
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	180	185	190	
tct gac ctc tac acc ctc agc agc tca gtg act gta acc tcg agc acc				624
Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr	195	200	205	
tgg ccc agc cag tcc atc acc tgc aat gtg gcc cac ccg gca agc agc				672
Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser	210	215	220	
acc aag gtg gac aag aaa att gag ccc aga ggg ccc aca atc aag ccc				720
Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro	225	230	235	240
tgt cct cca tgc aaa tgc cca gca cct aac ctc ttg ggt gga cca tcc				768
Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser	245	250	255	
gtc ttc atc ttc cct cca aag atc aag gat gta ctc atg atc tcc ctg				816
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu	260	265	270	
agc ccc ata gtc aca tgt gtg gtg gtg gat gtg agc gag gat gac cca				864
Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro	275	280	285	
gat gtc cag atc agc tgg ttt gtg aac aac gtg gaa gta cac aca gct				912
Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala	290	295	300	

ES 2 405 618 T3

cag aca caa acc cat aga gag gat tac aac agt act ctc cgg gtg gtc 960
 Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
 305 310 315 320

agt gcc ctc ccc atc cag cac cag gac tgg atg agt ggc aag gag ttc 1008
 Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
 325 330 335

aaa tgc aag gtc aac aac aaa gac ctc cca gcg ccc atc gag aga acc 1056
 Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
 340 345 350

atc tca aaa ccc aaa ggg tca gta aga gct cca cag gta tat gtc ttg 1104
 Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
 355 360 365

cct cca cca gaa gaa gag atg act aag aaa cag gtc act ctg acc tgc 1152
 Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
 370 375 380

atg gtc aca gac ttc atg cct gaa gac att tac gtg gag tgg acc aac 1200
 Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
 385 390 395 400

aac ggg aaa aca gag cta aac tac aag aac act gaa cca gtc ctg gac 1248
 Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
 405 410 415

tct gat ggt tct tac ttc atg tac agc aag ctg aga gtg gaa aag aag 1296
 Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
 420 425 430

aac tgg gtg gaa aga aat agc tac tcc tgt tca gtg gtc cac gag ggt 1344
 Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
 435 440 445

ctg cac aat cac cac acg act aag agc ttc tcc cgg act ccg ggt aaa 1392
 Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 450 455 460

tga 1395

<210> 66

<211> 464

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 39-10 cadena H

<400> 66

ES 2 405 618 T3

Met Asp Trp Leu Trp Asn Leu Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
 1 5 10 15

Ile Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys
 20 25 30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45

Thr Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 50 55 60

Lys Trp Met Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
 65 70 75 80

Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser
 85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr
 100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125

Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro
 130 135 140

Leu Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly
 145 150 155 160

Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn
 165 170 175

Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 180 185 190

Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr
 195 200 205

ES 2 405 618 T3

Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser
210 215 220

Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro
225 230 235 240

Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser
245 250 255

Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu
260 265 270

Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro
275 280 285

Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala
290 295 300

Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val
305 310 315 320

Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe
325 330 335

Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr
340 345 350

Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu
355 360 365

Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys
370 375 380

Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn
385 390 395 400

Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp
405 410 415

Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys
420 425 430

Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly
435 440 445

Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 67

<211> 717

5 <212> ADN

<213> Artificial

ES 2 405 618 T3

<220>

<223> polipéptido sintético: 39-10 cadena L

<220>

<221> CDS

5 <222> (1).. (717)

<223>

<400> 67

atg gag aca gac aca ctc ctg cta tgg gtg ctg ctg ctc tgg gtt cca	48
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro	
1 5 10 15	
ggt tcc aca ggt gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct	96
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala	
20 25 30	
gtg tct cta ggg cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt	144
Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser	
35 40 45	
gtt gat agt tat ggc aat agt ttt atg cac tgg tac cag cag aaa cca	192
Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro	
50 55 60	
gga cag cca ccc aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct	240
Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser	
65 70 75 80	
ggg atc cct gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct agg aca gac ttc acc	288
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr	
85 90 95	
ctc acc att aat cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt	336
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys	
100 105 110	

ES 2 405 618 T3

cag caa agt aat gag gat cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg 384
 Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 gaa atc aaa cgg gct gat gct gca cca act gta tcc atc ttc cca cca 432
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
 130 135 140
 tcc agt gag cag tta aca tct gga ggt gcc tca gtc gtg tgc ttc ttg 480
 Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
 145 150 155 160
 aac aac ttc tac ccc aaa gac atc aat gtc aag tgg aag att gat ggc 528
 Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
 165 170 175
 agt gaa cga caa aat ggc gtc ctg aac agt tgg act gat cag gac agc 576
 Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
 180 185 190
 aaa gac agc acc tac agc atg agc agc acc ctc acg ttg acc aag gac 624
 Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
 195 200 205
 gag tat gaa cga cat aac agc tat acc tgt gag gcc act cac aag aca 672
 Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
 210 215 220
 tca act tca ccc att gtc aag agc ttc aac agg aat gag tgt tag 717
 Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230 235

<210> 68

<211> 238

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> polipéptido sintético: 39-10 cadena L

<400> 68

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

ES 2 405 618 T3

Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu
145 150 155 160

Asn Asn Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly
165 170 175

Ser Glu Arg Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser
180 185 190

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp
195 200 205

Glu Tyr Glu Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr
210 215 220

Ser Thr Ser Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230 235

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo quimérico o humanizado o fragmento del mismo que se une a la proteína FZD10 y en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y las CDR del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 (FERM BP-10628).
- 5 2. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 que es un anticuerpo quimérico que comprende:
- (i) una región V de cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 13 y una región V de cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 21; o
- 10 (ii) una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 46 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 48.
3. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que es un anticuerpo quimérico que comprende adicionalmente una región de anticuerpo C humana (constante) o que es un anticuerpo humanizado que comprende adicionalmente una región de anticuerpo FR humana (estructura principal) y/o una región C de anticuerpo humano.
- 15 4. Un anticuerpo monoclonal de ratón o fragmento del mismo que comprende una cadena H que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 58 y una cadena L que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 60.
5. El anticuerpo monoclonal de ratón o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 4 que se produce por el clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628).
- 20 6. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que se marca con una marca de radioisótopo o una marca fluorescente.
7. El anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la marca de radioisótopo se selecciona de ⁹⁰itrio (⁹⁰Y), ¹²⁵yodo (¹²⁵I) y ¹¹¹indio (¹¹¹In).
8. Un clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628) que produce el anticuerpo monoclonal de ratón 92-13.
- 25 9. Un anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para uso en un método para tratar o evitar una enfermedad que se asocia con el homólogo Frizzled 10 (FZD10) en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de un conjugado de dicho anticuerpo o fragmento con un fármaco antineoplásico o radionucleótido, en donde la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).
- 30 10. Un método para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad que se asocia con el homólogo Frizzled 10 (FZD10) o de una predisposición de desarrollar la enfermedad en un sujeto, que comprende:
- (a) poner en contacto una muestra o un espécimen del sujeto con dicho anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7;
- 35 (b) detectar la proteína FZD10 en la muestra o espécimen; y
- (c) juzgar si o no el sujeto sufre de o está en riesgo de desarrollar la enfermedad con base en la abundancia relativa de la proteína FZD 10 comparado con un control, en donde la enfermedad que se asocia con FZD 10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).
- 40 11. El anticuerpo de la reivindicación 6 o 7 para uso en un método para formación de imágenes in vivo de la proteína de homólogo Frizzled 10 (FZD10) en un sujeto, dicho método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de dicho anticuerpo.
- 45 12. Una composición farmacéutica para tratar o evitar una enfermedad asociada con el homólogo Frizzled 10 (FZD10), que comprende un conjugado del anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 con un fármaco antineoplásico o radionucleótido y un portador o excipiente farmacéuticamente

aceptable, en donde la enfermedad que se asocia con FZD10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

5 13. Un equipo para el diagnóstico o pronóstico de una enfermedad asociada con el homólogo Frizzled 10 (FZD10), que comprende el anticuerpo o fragmento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde la enfermedad que se asocia con FZD 10 se selecciona de sarcoma sinovial (SS), cáncer colorrectal, cáncer gástrico, leucemia mieloide crónica (CML), y leucemia mieloide aguda (AML).

14. Un método para producir un anticuerpo quimérico contra FZD10 que comprende:

(a) aislar el mRNA del clon de hibridoma 92-13 (FERM BP-10628);

(b) sintetizar el cADN de región V de cadena pesada y ligera del mRNA aislado utilizando una transcriptasa inversa;

10 (c) amplificar dicho cADN utilizando PCR;

(d) ligar el ADN de región V amplificada y el ADN que codifica una región C humana para producir un vector de expresión; y

(e) introducir el vector de expresión dentro de un anfitrión para producir el anticuerpo quimérico.

15 15. El método de la reivindicación 14, en donde los cebadores utilizados para amplificar dicho cADN de la región V de cadena pesada y dicha región V de cadena ligera utilizando PCR tienen las secuencias de nucleótidos de:

(a) SEQ ID NOS: 5 y 6 para dicha región V de cadena pesada; y

(b) SEQ ID NOS: 7 y 8 para dicha región V de cadena ligera.

16. Un método para producir un anticuerpo humanizado contra FZD10 que comprende:

20 (a) diseñar una secuencia de ADN en la que los CDR del anticuerpo de ratón derivados del anticuerpo monoclonal de ratón 92-13 (FERM BP-10628) se ligan a las regiones de estructura principal humanas (FR);

(b) sintetizar dicha secuencia de ADN mediante un método PCR utilizando cebadores que tienen regiones superpuestas en las regiones terminales de las CDR y FR;

(c) ligar el ADN sintetizado resultante al ADN que codifica una región C de anticuerpo humano;

25 (d) integrar el producto de ligado dentro de un vector de expresión; y

(e) introducir dicho vector de expresión dentro de un anfitrión y producir por lo tanto el anticuerpo humanizado.

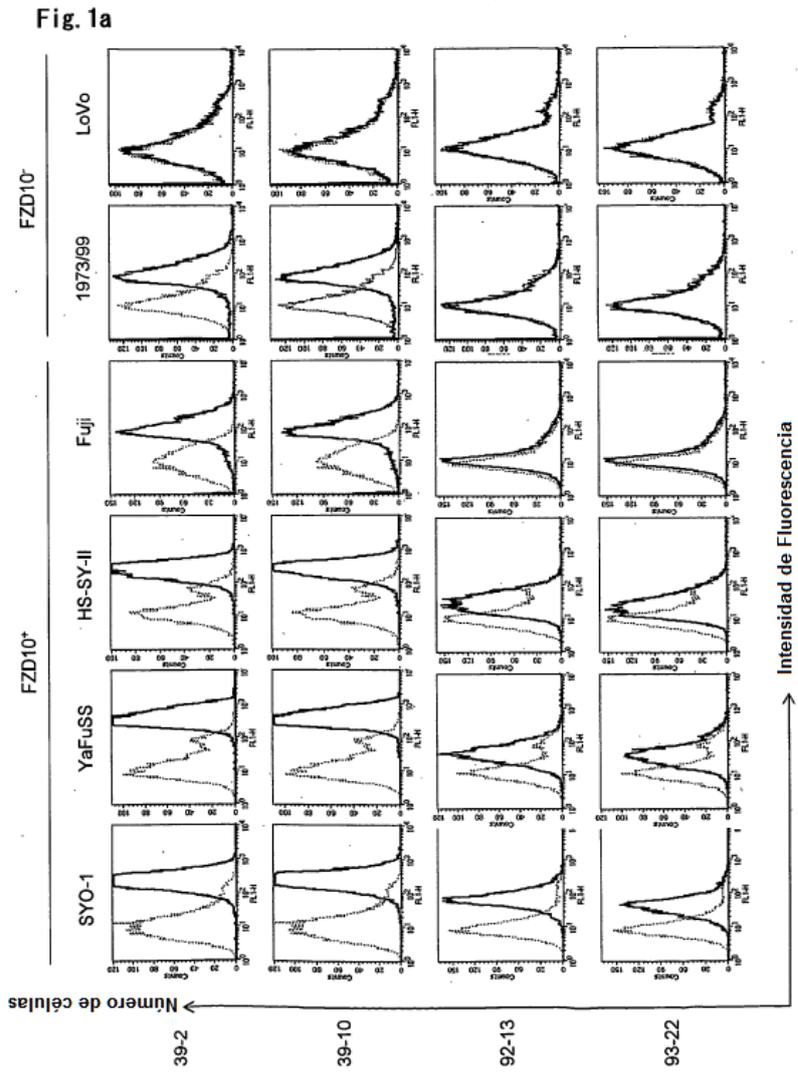


Fig. 1b

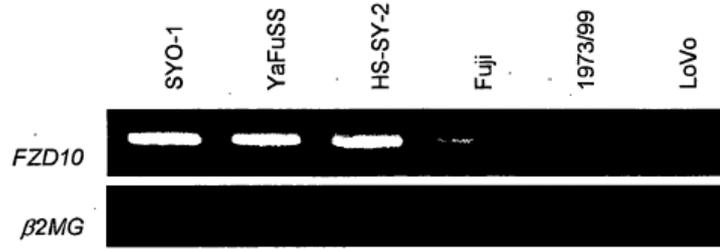


Fig. 1c

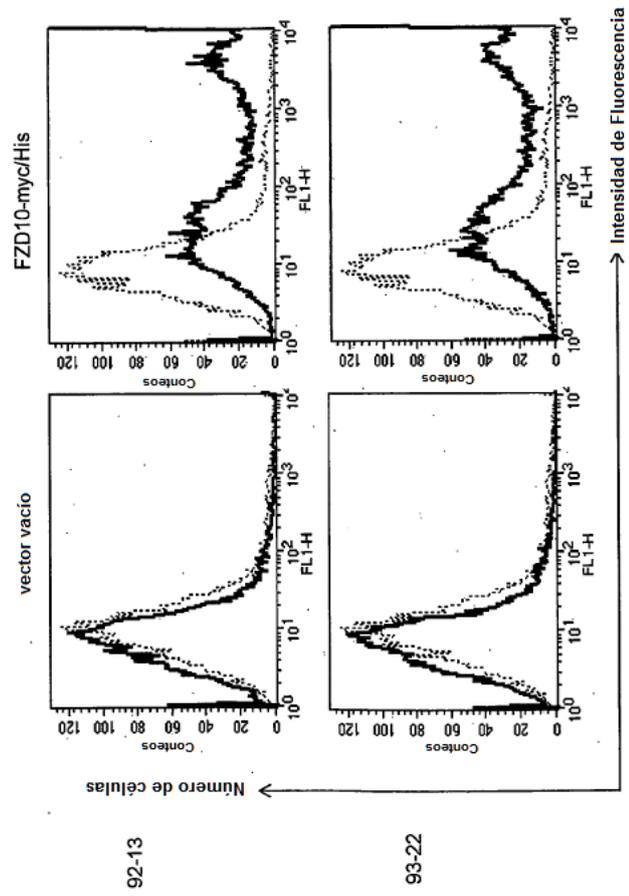


Fig. 1d

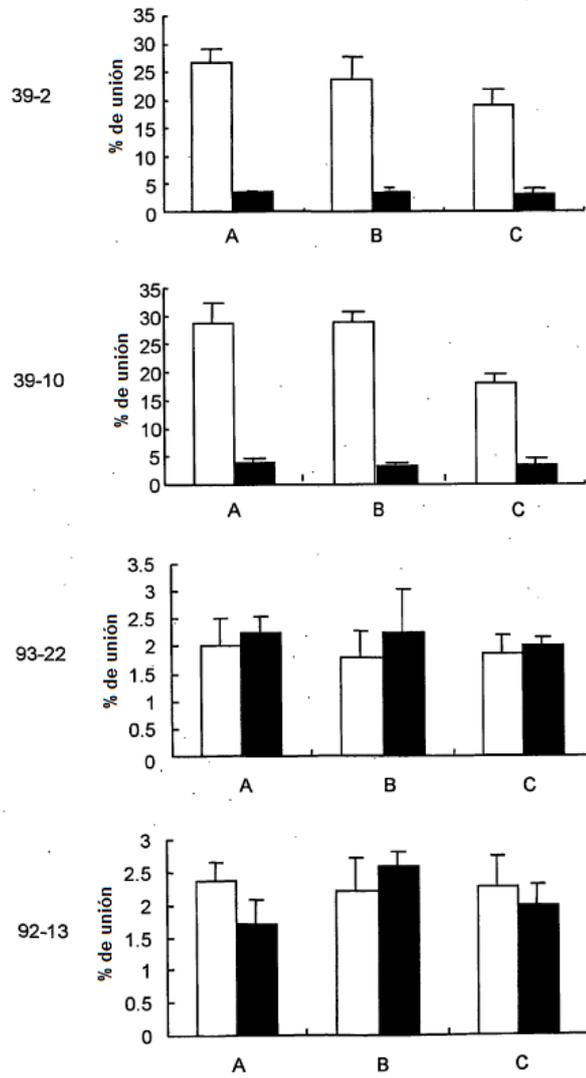


Fig. 1e

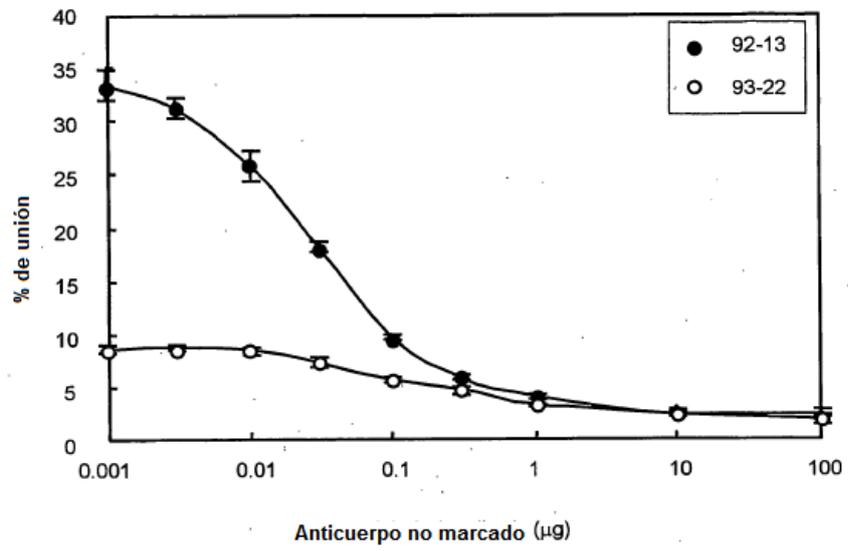


Fig. 1f

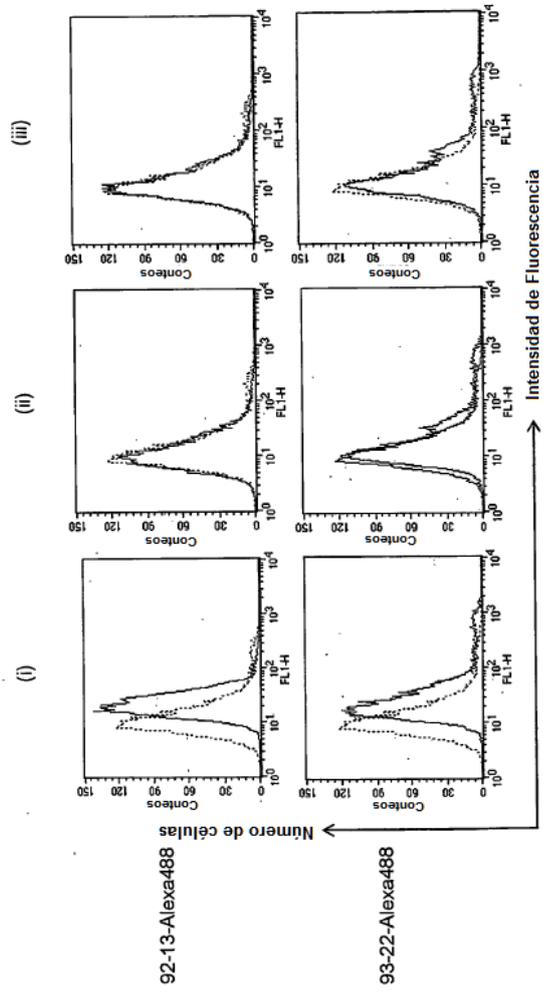


Fig. 2

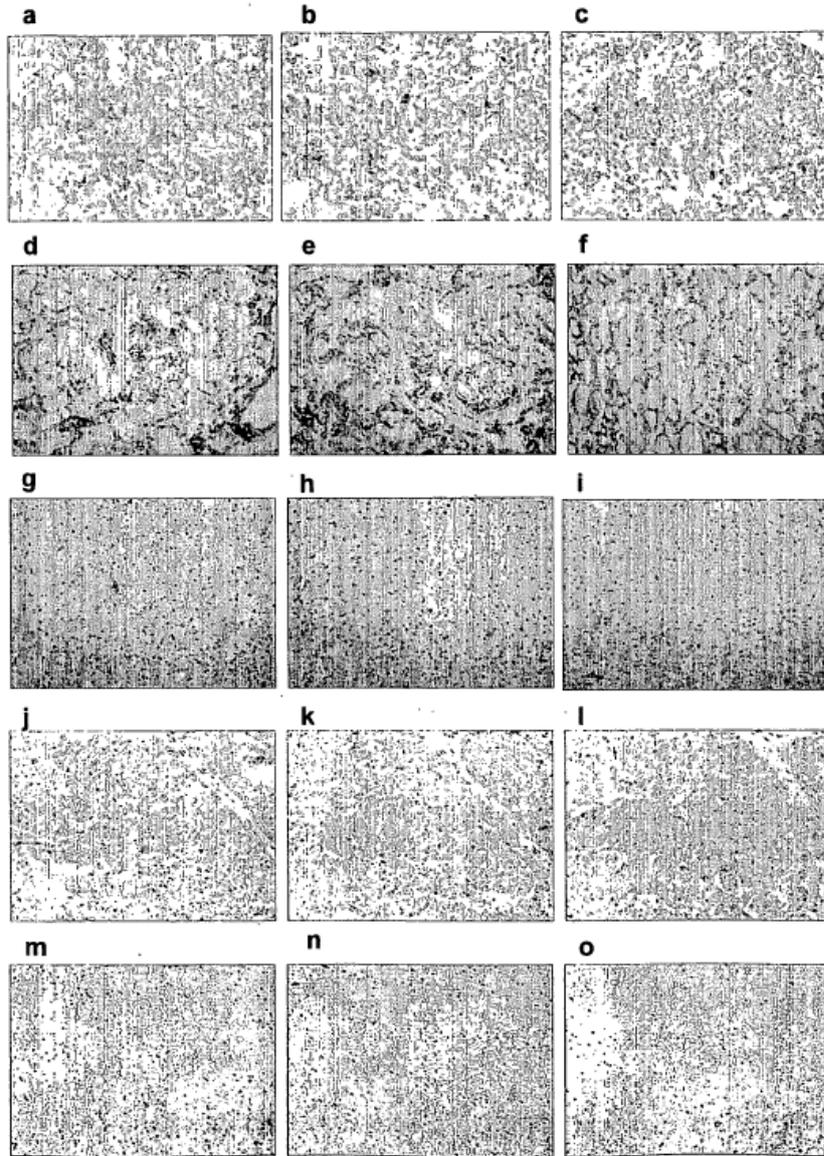


Fig. 3

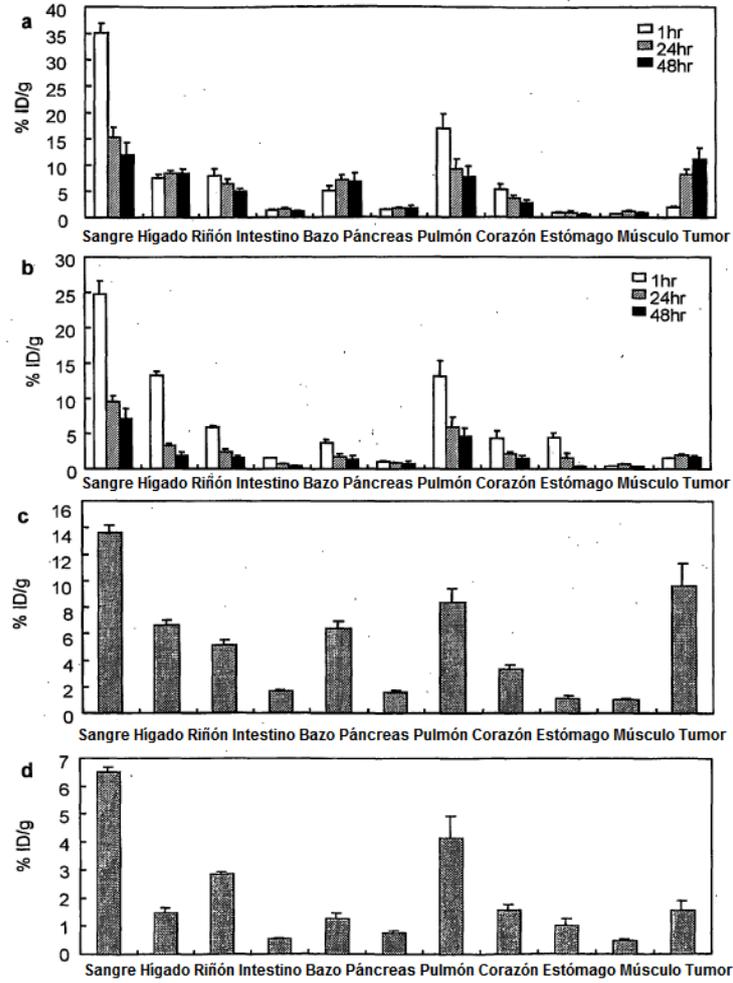


Fig. 4a

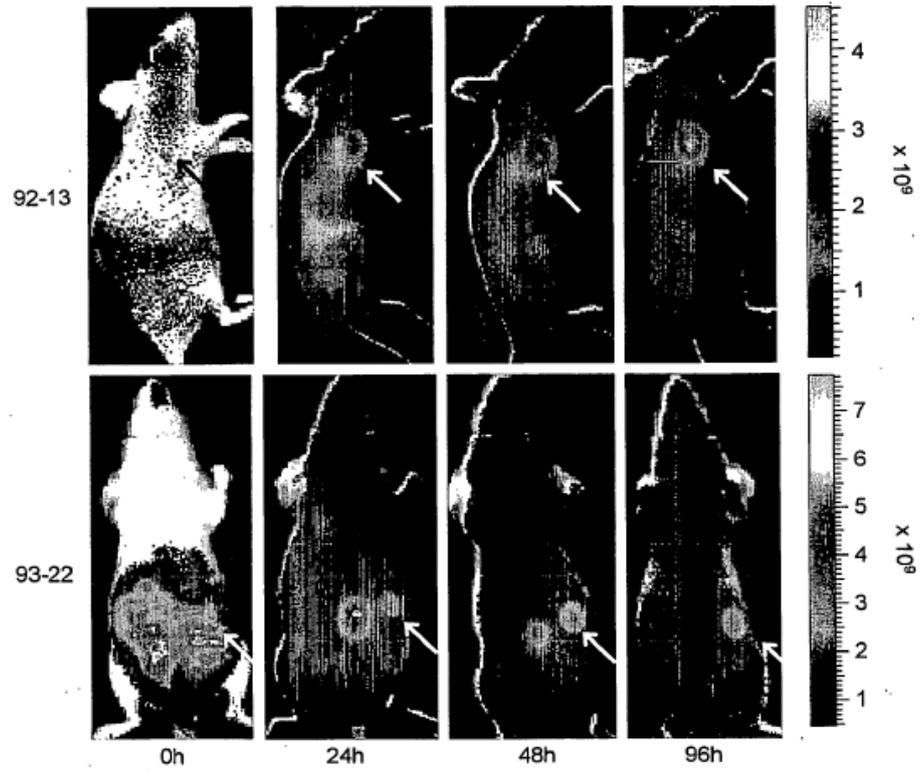


Fig. 4b

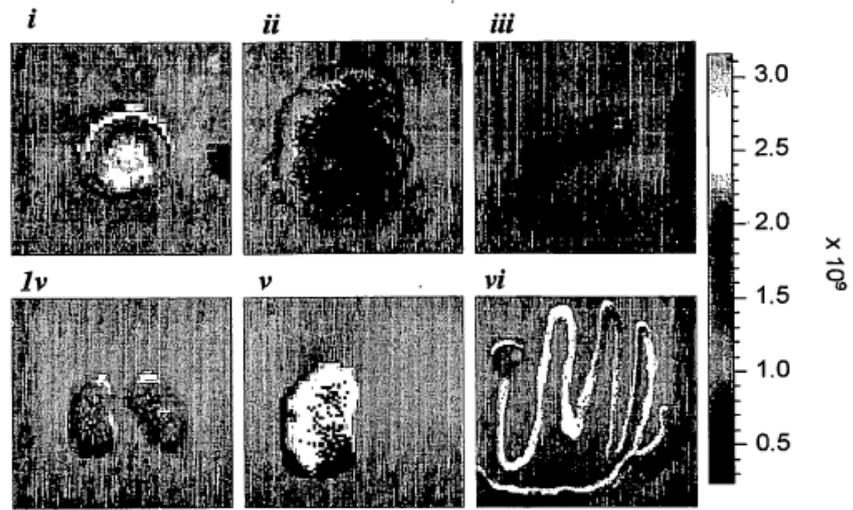


Fig. 4c

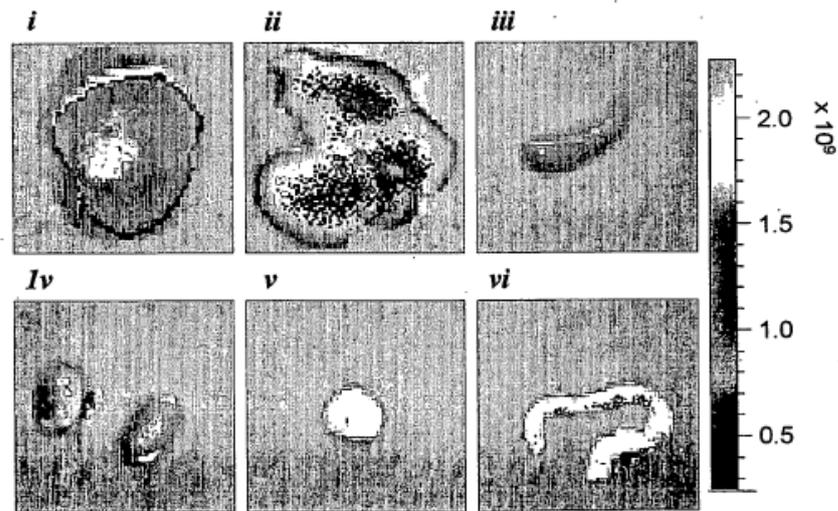


Fig. 5a

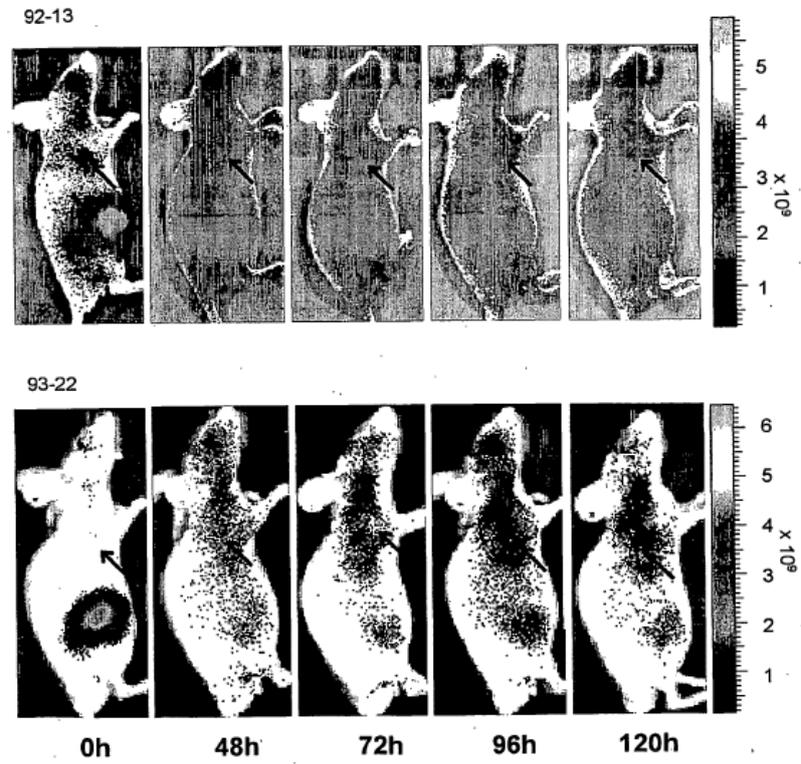


Fig. 5b

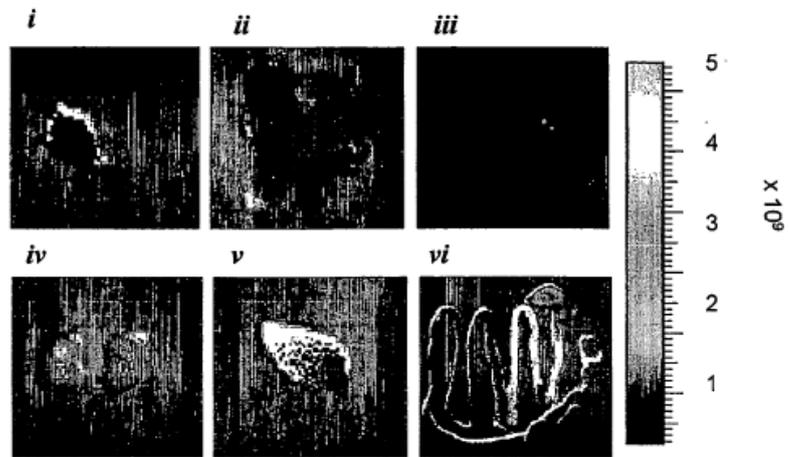


Fig. 5c

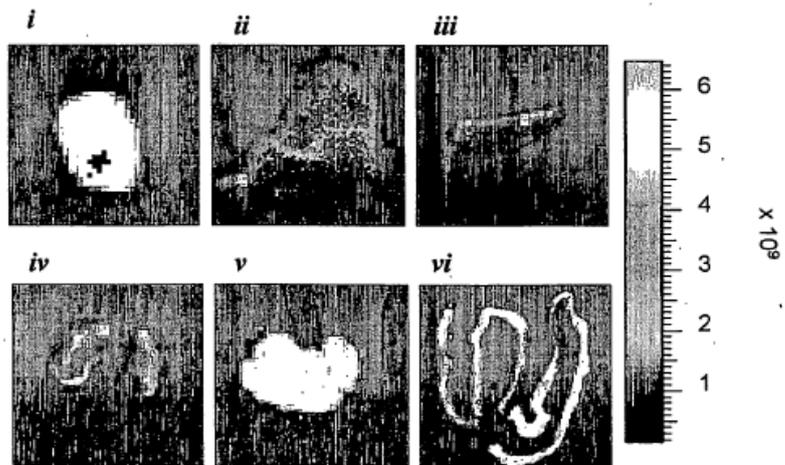


Fig. 6

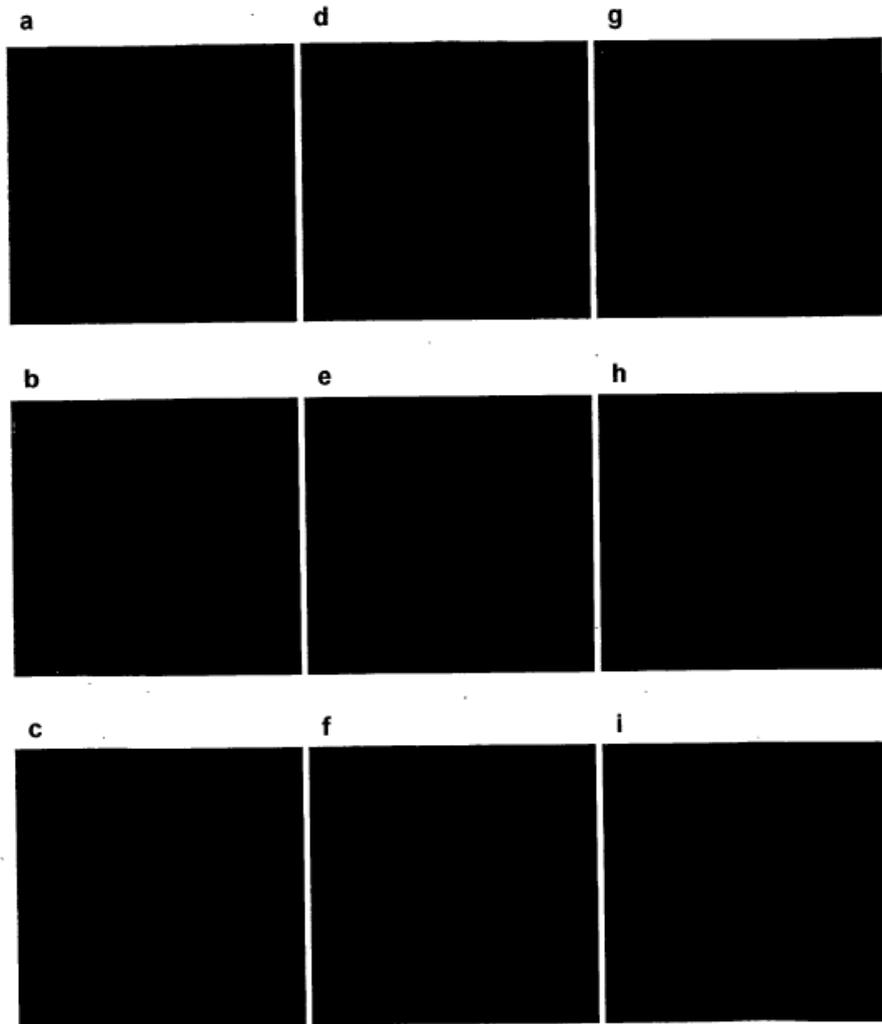


Fig. 7

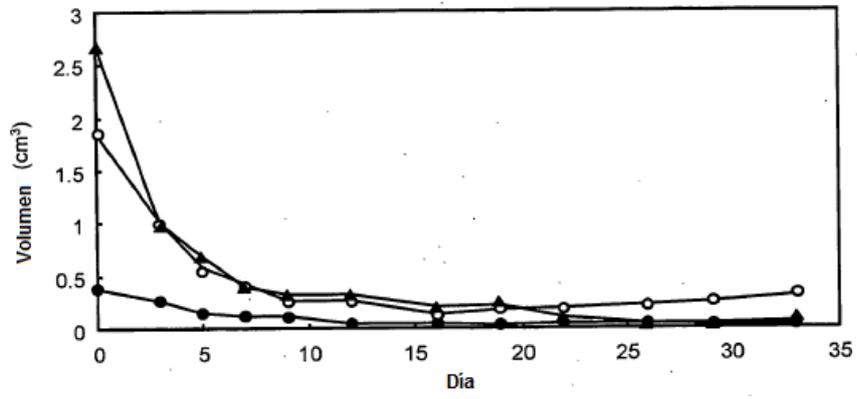


Fig. 8

