

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 521**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.03.2009 E 09721396 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 2275537**

54 Título: **Anticuerpos antihumanos frente a Dlk-1 que tienen actividad antitumoral**

30 Prioridad:

17.03.2008 US 69834

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

26.01.2015

73 Titular/es:

LIVTECH INC. (100.0%)
907 Nogawa Miyamae-ku Kawasaki-shi
Kanagawa 216-0001, JP

72 Inventor/es:

NAKAMURA, KOJI;
TAJIMA, RIE;
KUMAR, SHANKAR;
TSO, J. YUN y
TSURUSHITA, NAOYA

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 527 521 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 antihumanos frente a DLK-1 que tienen actividad antitumoral

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a anticuerpos antihumanos frente a Dlk-1 que tienen actividad antitumoral y, en particular, a anticuerpos antihumanos frente a Dlk-1 que tienen actividad antitumoral *in vivo*. Además, la presente invención también se refiere a hibridomas que producen los anticuerpos mencionados anteriormente y a un uso de los anticuerpos mencionados anteriormente.

Antecedentes de la invención

El Dlk-1 (homólogo 1 similar a delta (*Drosophila*)) humano, que en lo sucesivo se puede denominar "hDlk-1") es una proteína transmembrana de tipo 1 (tipo transmembrana uno) con una longitud completa de 383 residuos de aminoácidos que tiene 6 motivos de tipo EGF en su región extracelular. La región extracelular muestra homología con una familia Notch/Delta/Serrate. Se ha clonado un gen hDlk-1 como molécula expresada en una línea celular derivada de carcinoma microcítico de pulmón respondedor a GRP (péptido liberador de gastrina) (documento no patente 1) o como factor para suprimir la diferenciación preadipocitos (documento no patente 2). Desde el punto de vista de la homología de la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 con la de delta que es un ligando de un receptor nocht como regulador de la diferenciación celular, dicho Dlk-1 generalmente es un símbolo génico, DLK1. También tiene otros diversos símbolos génicos tales como Pref-1 (documento no patente 2), pG2 (documento no patente 3), SCP-1 (documento no patente 4) y ZOG (documento no patente 5). No obstante, estos símbolos génicos básicamente indican la misma molécula.

Además, hDlk-1 se escinde con una proteasa sin identificar que corta las proximidades de la membrana celular en la región extracelular de hDlk-1 y después se secreta en la sangre. El hDlk-1 libre (región extracelular de hDlk-1) es una molécula idéntica a una glicoproteína denominada FA-1 (antígeno fetal 1) (documento no patente 6) que consiste en 225 a 262 residuos de aminoácidos.

El gen de hDlk-1 y un producto génico del mismo se expresan a un nivel alto en células fetales no diferenciadas y altamente proliferativas. En particular, el gen de hDlk-1 y el producto génico del mismo se expresan altamente en hígado fetal, riñón fetal, músculo esquelético fetal, cerebro fetal y similares. No obstante en el nacimiento, la expresión de dicho gen de hDlk-1 y un producto génico del mismo no se puede observar en la mayoría de los tejidos. En tejidos adultos normales, el gen de hDlk-1 y el producto génico del mismo se localizan en la glándula suprarrenal, la placenta y la hipófisis (documento patente 1, documento no patente 2).

Adicionalmente, incluso en tejidos maduros, se observa expresión de hDlk-1 en células que se consideran células madre indiferenciadas o células precursoras. Por ejemplo, se ha notificado que la expresión de hDlk-1 se ha observado en células ovales hepáticas que están indiferenciadas y son pluripotenciales en hígados adultos (documentos no patente 7 y 8) o en células madre mesenquimatosas que son las células madre de células óseas/cartilaginosas/adiposas (documento no patente 9). Se ha sugerido que hDlk-1 está asociado con las propiedades de dichas células madre tisulares, tal como el mantenimiento de la capacidad de indiferenciación.

Dicho patrón de expresión de hDlk-1 restringida en las células fetales o las células madre y una familia de genes/productos génicos que tienen motivos de tipo EGF (receptor Notch, ligando de Notch (delta, Jagged, serrate), etc.) generalmente controla el crecimiento o diferenciación de las células mediante interacción intercelular mediante motivos de tipo EGF. Por tanto, se ha sugerido que hDlk-1 también tiene dichas funciones. De hecho, se ha sabido bien que la expresión de hDlk-1 disminuye de forma concomitante con la diferenciación de las células precursoras adiposas y que la diferenciación adiposa se suprime, si se fuerza la expresión del gen de hDlk-1 en las células precursoras adiposas (documento no patente 2). No obstante, en la actualidad, los detalles sobre una molécula (un ligando) que interacciona con hDlk-1.

Por otro lado, se ha notificado que el gen de hDlk-1 y el producto génico del mismo se expresan con una frecuencia elevada de varios tipos de cánceres o tumores. Los tipos de cáncer en los que hasta ahora se ha confirmado la expresión de hDlk-1 incluyen: cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis de tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer renal y cáncer de ovarios (documentos patente 1 y 2 y documentos no patente 1, 3, 10, 11, 12, 13 y 14) y cánceres de sangre tales como síndrome mielodisplásico (documento patente 3 y documentos no patente 15 y 16) y leucemia mielocítica aguda (documento no patente 16). Se ha notificado que el crecimiento celular se acelera si se introduce un gen de hDlk-1 en una célula K562 que es una línea celular de eritroleucemia (documento no patente 16) y también que, si dicho gen de hDlk-1 se introduce en glioblastomas, produce la desaparición de la inhibición por contacto de las células, así como la aceleración del crecimiento celular, de modo que se puede lograr una capacidad de crecimiento celular independiente del anclaje. Se ha sugerido la relación entre hDlk-1 y carcinogénesis (documento no patente 17).

El documento WO 2005/052156 divulga métodos de detección de cáncer hepático, un diagnóstico de cáncer hepático y un remedio para el cáncer.

<Documentos patente>

Documento de patente 1: WO 2005/052156
Documento de patente 2: WO 02/081625
Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa abierta a consulta por el público Nº 2001 -269174

<Documentos no patente>

Documento no patente 1: Laborda, J. et al., J. Biol. Chem., vol. 268 (6), pp. 3817-3820 (1993)
Documento no patente 2: Smas, C. M. et al., Cell, vol. 73 (4), pp.725-734 (1993)
Documento no patente 3: Helman, L. J. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 84, pp. 2336-2339 (1987)
Documento no patente 4: Maruyama, K. et al., No publicado, número de acceso en Genbank D16847 (1993)
Documento no patente 5: Halder, S. K. et al., Endocrinology, vol. 139, pp. 3316-3328 (1998)
Documento no patente 6: Fay, T. N. et al., Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol., vol. 29, pp. 73-85 (1988)
Documento no patente 7: Tanimizu, N. et al., Gene Expression Patterns, vol. 5, pp. 209-218 (2004)
Documento no patente 8: Jensen, CH. et al., Am. J. Pathol., vol. 164 (4), pp.1347-1359 (2004)
Documento no patente 9: Abdallah, B. M. et al., J. Bone Miner. Res., vol. 19 (5), pp. 841-852 (2004)
Documento no patente 10: Jensen, C. H. et al., Br. J. Dermatol., vol. 140 (6), pp. 1054-1059 (1999)
Documento no patente 11: Jensen, C. H. et al., Tumour Biol., vol. 20 (5), pp. 256-262 (1999)
Documento no patente 12: Yin, D. et al., Int. J. Oncol., vol. 24 (4), pp. 1011-1015 (2004)
Documento no patente 13: Yin, D. et al., Oncogene, vol. 25 (13), pp. 1852-1861 (2006)
Documento no patente 14: Fukuzawa, R. et al., J. Clin. Pathol., vol. 58, pp. 145-150 (2006)
Documento no patente 15: Miyazato, A. et al., Blood, vol. 98, pp. 422-427 (2001)
Documento no patente 16: Sakajiri, S. et al., Leukemia, vol. 19 (8), pp. 1404-1410 (2005)
Documento no patente 17: Yin, D. et al., Oncogene, vol. 25 (13), pp. 1852-1861 (2006)

Sumario de la invención

Como se ha descrito anteriormente, en el caso de los tejidos normales, la expresión de hDlk-1 está restringida en las células embrionarias o células madre. No obstante, en el caso de los tejidos de cáncer, hDlk-1 se expresa con una frecuencia elevada en varios tipo de células. Dicho hDlk-1 es una proteína de membrana celular/proteína secretora. En base a estos hechos, se considera que hDlk-1 es una buena diana en el tratamiento de varios tipos de tumores, etc. Cuando este hDlk-1 es la diana, un anticuerpo anti-hDlk-1 se considera útil.

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-hDlk-1 que tiene actividad antitumoral, específicamente un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 que tiene actividad antitumoral in vivo y, particularmente, el anticuerpo mencionado anteriormente, que es un anticuerpo humanizado. Además, otro objeto de la presente invención es proporcionar un complejo del anticuerpo mencionado anteriormente y un agente, una composición farmacéutica para diagnosticar o tratar un tumor, un método para detectar un tumor y un kit para detectar o diagnosticar un tumor.

Los presentes inventores han realizado estudios intensos dirigidos a conseguir los objetos mencionados anteriormente. Como resultado, los inventores han descubierto un anticuerpo que reacciona específicamente con hDlk-1 (en particular, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1) y tiene actividad antitumoral y un complejo (un inmunoconjugado) del anticuerpo y varios tipos de agentes. Los inventores han confirmado que dicho anticuerpo y un complejo tienen actividad antitumoral in vivo. Adicionalmente, los presentes inventores han tenido éxito en la producción de los anticuerpos mencionados anteriormente, que es un anticuerpo humanizado. Todavía más, los presentes inventores también han hallado que dicho anticuerpo y un complejo son útiles para el tratamiento, diagnóstico y detección de un tumor, de modo que se completa la presente invención.

Es decir, la presente invención es del siguiente modo.

(1) Un anticuerpo contra hDlk-1, donde la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena Ha comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID Nº 67 o 68 y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra el la SEC ID Nº 71.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo humanizado, por ejemplo.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene una actividad antitumoral in vivo, por ejemplo.

La actividad antitumoral del anticuerpo de la presente invención es una actividad inhibidora de la angiogénesis, por ejemplo. En el presente documento, el tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón

microcítico y neuroblastoma humano.

En el anticuerpo de la presente invención, las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H son, respectivamente, una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 50 a 54, una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 69 a 85 y una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 118 a 125, en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 74 o 76. Además, la secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L son, respectivamente, una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 44 a 59, una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 75 a 81 y una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 114 a 122, en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 78.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo.

El anticuerpo de la presente invención es, por ejemplo, un anticuerpo que se une a al menos una porción de una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 26 a 85, una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 92 a 167 o una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 131 a 244, en la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 como se muestra en la SEC ID N° 2.

(2) Un fragmento del anticuerpo contra el Dlk-1 humano de acuerdo con (1) anterior, donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H mostrada en la SEC ID N° 67 o 68 y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L mostrada en la SEC ID 71.

(3) Un complejo anticuerpo – agente que comprende el anticuerpo de acuerdo con (1) anterior y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad de destrucción celular.

Un complejo fragmento de anticuerpo – agente que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (2) anterior y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad de destrucción celular.

En el complejo de la presente invención, la actividad antitumoral es una actividad inhibidora de la angiogénesis, por ejemplo. En el presente documento, el tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

(4) El anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (2) anterior o el complejo de acuerdo con (3) anterior para su uso en el tratamiento de un tumor o en la inhibición de la angiogénesis tumoral.

El tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

(5) El anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (2) anterior o el complejo de acuerdo con (3) anterior para su uso in vivo en el diagnóstico o detección de un tumor.

El tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

(6) Un método in vivo para diagnosticar o detectar un tumor usando el anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (2) anterior o el complejo de acuerdo con (3) anterior.

En una forma de realización, dicho método comprende: permitir que al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o complejo anterior reaccione con una muestra recolectada de un cuerpo vivo y detectar una o más señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.

En el método in vitro para diagnosticar o detectar un tumor de la presente invención, el tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

(7) Un método para inhibir una angiogénesis tumoral in vitro que comprende tratar un tumor con el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o el complejo del mismo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

(8) Un kit para tratar, diagnosticar o detectar tumores, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste del anticuerpo de acuerdo con (1) anterior, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con (2) anterior y el complejo de acuerdo con (3) anterior.

En el kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor de la presente invención, el tumor es al menos de un tipo seleccionado de, por ejemplo, el grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los resultados obtenidos administrando 3 clones (1C1, 4C4 and 31C4) de un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 conocido (documento WO 2005/052156) a modelos de tratamiento de xenoinjerto usando una línea celular de cáncer de hígado que expresa hDlk-1 (células Huh-7-hDlk-1). Cada anticuerpo se administró por vía intraperitoneal al modelo un total de 4 veces (indicado con las fechas de las figuras), es decir el primer día (día 1), el cuarto día (día 4), el séptimo día (día 7) y el décimo día (día 10).

Figura 1A: IgG de rata (grupo control) (●), 1C1 (○)

Figura 1B: IgG de rata (grupo control) (●), 4C4 (○)

Figura 1C: IgG de rata (grupo control) (●), 31C4 (○)

En cada una de las figuras 1A a 1C, el número de ratones de cada grupo estaba representado por N y los valores de cada medición (volumen tumoral) estaba representado por un valor medio $\pm$ error estándar. En cada caso se llevaron a cabo al menos 3 experimentos independientes. En todos los casos no se observó actividad antitumoral frente a cáncer de hígado establecido por vía subcutánea en ratones atímicos.

La Figura 2 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de un nuevo clon DI-2-14 del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (IgG1 de ratón) en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando las células Huh-7-hDlk-1.

Figura 2A: El crecimiento tumoral en un grupo control (IgG de ratón) y un grupo de administración de DI-2-14 se indicó con el tiempo transcurrido (un valor medio $\pm$ error estándar). La flecha indica la administración del anticuerpo (20 mg/kg de peso corporal, administración intraperitoneal). * $P < 0,01$ (mediante prueba t de Student)

Figura 2B: Una figura obtenida representando el peso del tumor de cada ratón el día 14 (Día 14) (el último día del experimento) en la prueba de la figura 2A anterior. El valor numérico descrito en cada gráfico indica un valor medio $\pm$ error estándar. * $P < 0,01$ (mediante prueba t de Student)

Figura 2C: Los resultados obtenidos evaluando la actividad antitumoral de DI-2-14 en otro experimento independiente. * $P < 0,01$ (mediante prueba t de Student)

La Figura 3 muestra la evaluación de la actividad antitumoral de A: clon 2-13 (IgG2b de rata), B: clon BA-1-3D (IgG2a de ratón), C: clon DI-6 (IgG1 de ratón) y D: clon M3-1 (IgG1 de ratón), en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando células Huh-7-hDlk-1. El volumen tumoral está indicado por un valor medio $\pm$ error estándar. El asterisco muestra los resultados de una prueba de diferencia significativa (* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ mediante la prueba t de Student).

La Figura 4 muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (clon 2-13) en modelos de tratamiento de xenoinjerto usando la línea celular de cáncer de colon que expresa hDlk-1 (células SW480-hDlk-1). Las células SW480-hDlk-1 se transplantaron por vía subcutánea en ratones atímicos para establecer tejidos de cáncer de colon. La flecha indica la administración intraperitoneal del anticuerpo (20 mg/kg de peso corporal) a los ratones. El volumen tumoral se indicó con un valor medio $\pm$ error estándar (* $P < 0,01$, ** $P < 0,05$ mediante la prueba t de Student).

La figura 5 muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 con células HEK293-hDlk-1 medida mediante citometría de flujo. El número descrito en cada histograma indica cada número de clon. Las porciones rellenas indican el isotipo de los anticuerpos control. Las porciones de líneas negras indican los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1.

La figura 6 muestra la reactividad de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 con células Huh-7-hDlk-1 medida mediante citometría de flujo. El número descrito en cada histograma indica cada número de clon. Las porciones rellenas indican el isotipo de los anticuerpos control. Las porciones de líneas negras indican los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1.

La Figura 7 es una visión esquemática que muestra mutantes en los que se ha delecionado cada motivo de tipo EGF que se produjeron con el fin de analizar los epítomos reconocidos por los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1.

La Figura 8 muestra los resultados del análisis de epítomos del clon DI-2-14.

Figura 8A: Una figura que muestra los resultados obtenidos mediante transfección transitoria de cada mutante del gen de hDlk-1 descrito en las células COS-7 mediante lipofección y, después, realizando un análisis FACS en las células de 24 a 72 horas después de la transfección génica (izquierda: IgG1 de ratón, derecha: DI-2-14). Las porciones seleccionadas indican las células que expresan los mutantes reconocidos por el clon DI-2-14.

Figura 8B: Fotografías que muestran los frotis de células COS-7 que expresan EGF (1-2) inmunoteñidas con un control positivo (un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1) y el clon DI-2-14. Las porciones teñidas en color rojo parduzco indican la expresión del EGF (1-2).

La Figura 9 muestra los resultados de los análisis de los epítomos de los clones DI-6, BA-1-3D y 2-13.

Figura 9A: Una figura que muestra los resultados obtenidos mediante transfección transitoria de cada mutante del gen de hDlk-1 descrito en las células COS-7 mediante lipofección y, después, realizando un análisis FACS en las células de 24 a 72 horas después de la transfección génica. Las porciones seleccionadas indican las células que expresan los mutantes reconocidos por cada clon.

Figura 9B: Fotografías que muestran los frotis de células COS-7 que expresan EGF (1-2) inmunoteñidas con los clones DI-6, BA-1-3D y 2-13. Las porciones teñidas en color rojo parduzco, indicadas por las flechas, muestran la expresión del EGF (1-2).

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de epítomos del clon M3-1 mediante FACS.

Los resultados obtenidos mediante transfección transitoria de cada mutante del gen de hDlk-1 descrito en las células COS-7 mediante lipofección y, después, realizando un análisis FACS en las células de 24 a 72 horas después de la transfección génica. Las porciones seleccionadas indican las células que expresan los

mutantes reconocidas por DI-2-14.

La Figura 11 muestra los resultados analíticos de la actividad internalización de cada anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 después de unirse a un antígeno.

Figura 11A: Se dejó que las células HEK293-hDlk-1 reaccionaran con cada anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (clones M3-1, M1-290 y M3-4) (4 °C, 20 minutos) y las células resultantes se lavaron después con PBS 2 veces. Posteriormente, las células se incubaron a 37 °C durante el período de tiempo tal como se describe en la figura. Posteriormente, las células se dejaron reaccionar con IgG anti-ratón marcado con PE, seguido de análisis FACS. Los resultados se indican con valores relativos, que se obtienen cuando la intensidad media de fluorescencia en el caso de no incubación (0 minutos) se define como del 100 %.

Figura 11B: El clon M3-1 marcado con FITC (FITC-M3-1) se dejó reaccionar con las células HEK293-hDlk-1 (4 °C, 20 minutos) y las células resultantes se lavaron después con PBS 2 veces. A continuación, las células se incubaron a 37 °C durante 120 minutos. La Figura 11B muestra un cambio en la intensidad media de fluorescencia obtenida como resultado de la incubación mencionada en lo que antecede. La columna de color negro indica un cambio en la intensidad media de fluorescencia obtenida cuando el M3-1 no marcado se hizo reaccionar con las células de la misma manera que en la figura 11A anteriormente, las células se incubaron después a 37 °C durante 120 minutos y a continuación se las dejó reaccionar IgG anti-ratón marcado con PE. La Figura 12 muestra los resultados analíticos de la actividad internalización de cada anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 marcado con rodamina después de unirse a un antígeno.

Figura 12A: Se dejó que las células HEK293-hDlk-1 reaccionaran M3.1 marcado con rodamina (4 °C, 20 minutos) y las células resultantes se lavaron después con PBS 2 veces. Inmediatamente después del lavado, se preparó un frotis y se observó la localización de Rho-M3-1 con un microscopio de fluorescencia. La Figura 12A es una fotografía que muestra tal localización de Rho-M3-1. Las porciones de color naranja indican la localización de Rho-M3-1. Se observó la localización de Rho-M3-1 en la membrana celular.

Figura 12B a 12E: Rho-M3-1 (B), Rho-DI-1 (C) y Rho-M1-290 (D) y Rho-M3-4 (E) se dejaron reaccionar con las células HEK293-hDlk-1 y las células resultantes se lavaron después con PBS 2 veces, seguido de incubación a 37 °C durante 15 minutos. A continuación se prepararon frotis y la localización de cada clon se observó con un microscopio de fluorescencia. Las Figuras 12B a 12E son fotografías que muestran dicha localización de cada clon. Tanto Rho-M3-1 como Rho-DI-1, que reconocen los mismos epítomos (EGF 4-6), se incorporaron en las células y se localizaron en ellas en forma de puntos.

La Figura 13 muestra la actividad citotóxica de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 conjugados con saponina a las células Huh-7-hDlk-1 y SK-N-F1.

Figura 13A: Una figura que muestra los efectos de un control (IgG de ratón-saporina (IgG-SAP)) y M3-1-SAP en las células Huh-7-1-hDlk. El eje longitudinal indica la tasa de supervivencia de las células, que se indica mediante un valor relativo obtenido cuando la tasa de supervivencia de las células en el caso de la no adición de anticuerpo se define como del 100 % (N = 3, un valor medio $\pm$ desviación estándar).

Figura 13B: Una vista que muestra los efectos de un control (IgG-SAP), M3-1-SAP y M1-290-SAP en las células SK-N-F1.

En la Figura 14, la Figura 14A muestra un cambio en el peso corporal de cada ratón y la Figura 14B muestra la tasa de supervivencia de los ratones, que se obtuvo cuando se administró IgG de ratón (20 mg / kg de peso corporal), M3-1-SAP (5 mg / kg de peso corporal) y M1-290-SAP (5 mg / kg de peso corporal) a los modelos de xenoinjertos de células Huh-7-hDlk-1. El valor se indica mediante un valor medio $\pm$ desviación estándar. Las flechas indican el día en que se administraron los anticuerpos.

La Figura 15 muestra los efectos inhibidores del crecimiento tumoral de IgG de ratón (●; N = 8) y M3-1-SAP (○; N = 8) obtenidos cuando estos anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a los modelos de xenoinjerto de las células Huh-7-hDlk-1. Las flechas indican el día en que se administraron los anticuerpos. El valor se indica con un valor medio $\pm$ desviación estándar (*P < 0,01, **P < 0,05 mediante la prueba t de Student).

En la Figura 16, la Figura 16A muestra un efecto inhibidor del crecimiento tumoral y la Figura 16B muestra un cambio en el peso corporal, que se obtuvieron cuando se administró IgG de ratón (●; N = 5) y M3-1-SAP (○; N = 5) por vía intratumoral (40 μ g) a los modelos de xenoinjerto de células Huh-7-hDlk-1. La Figura 16C muestra un efecto inhibidor del crecimiento tumoral y la Figura 16D muestra un cambio en el peso corporal, que se obtienen cuando se administró PBS (●; N = 4) y cisplatino (○; N = 4) por vía intraperitoneal (5 mg / kg de peso corporal) a los modelos de xenoinjerto de células Huh-7-hDlk. En todas las figuras, las flechas indican el día donde se administraron los anticuerpos y el valor se indica con un valor medio $\pm$ desviación estándar (* P < 0,01, ** P < 0,05 mediante la prueba t de Student).

Figura 17 incluye fotografías que muestran ejemplos típicos de una matriz de tejido de cáncer de colon humano (fabricado por Cybrdi; C05-01-001) inmunoteñida con un anticuerpo anti-hDlk-1. Las porciones de color rojo parduzco indican tejidos teñidos cancerosos teñidos con el anticuerpo anti-hDlk-1. El término "negativo para hDlk-1" significa una sección donde no se observaron regiones manchadas, como en el caso de la sección N° 48 (varón de 69 años de edad con adenocarcinoma de grado III). La sección N° 19 (mujer de 55 años de edad con adenocarcinoma de Grado II) se tiñó fuertemente y las secciones teñidas al mismo nivel que la sección N° 19 se definieron como "fuertemente positivas a hDlk-1." Además, como en el caso de la sección N° 25 (varón de 75 años de edad, adenocarcinoma, grado II), una sección que claramente confirmada

como positiva para hDlk-1 y teñida ligeramente se definió como "débilmente positiva para hDlk-1".

La Figura 18 incluye fotografías que muestran ejemplos típicos de una matriz de tejido de cáncer de mama humano (fabricado por Cybrdi; CC08-02-002) inmunoteñida con un anticuerpo anti-hDlk-1. Las porciones de color rojo parduzco indican tejidos teñidos cancerosos teñidos con el anticuerpo anti-hDlk-1.

Las fotografías superiores muestran tejidos de las glándulas mamarias normales contenidos en la matriz de tejido, que se tiñeron con el anticuerpo anti-hDlk-1. Izquierda: N° 07 (mujer de 68 años de edad, glándula mamaria normal; negativo para hDlk-1), derecha: N° 01 (mujer de 43 años de edad, lóbulos normales de la glándula mamaria; débilmente positivo para hDlk-1). Las flechas indican porciones débilmente positivas para hDlk-1.

Las fotografías inferiores muestran los tejidos de pacientes con carcinoma ductal infiltrante. Izquierda: N° 08 (mujer de 45 años de edad, grado II; negativo para hDlk-1), centro: N° 56 (mujer de 28 años de edad, grado II; débilmente positivo para hDlk-1), derecha: N° 20 (mujer de 59 años de edad, grado II; fuertemente positivo para hDlk-1).

La Figura 19 muestra la actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon DI-2-14 en los modelos de tratamiento de xenoinjertos de células Huh-7-hDlk-1.

La Figura 20 muestra la actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon DI-2-14 en los modelos de tratamiento de xenoinjertos de células SK-N-F1.

La Figura 20A muestra el crecimiento del tumor después del inicio de la administración de los anticuerpos. El volumen tumoral se indicó con un valor medio $\pm$ error estándar (*P < 0,01, **P < 0,05 mediante la prueba t de Student).

La Figura 20B es un gráfico que muestra el peso de los tejidos de cáncer extirpados a los 23 días (día 23) después de la administración de los anticuerpos.

La Figura 21 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc (SEC ID N° 22) de la región variable de la cadena H (cadena pesada) (VH) del clon DI-2-14 y una supuesta secuencia de aminoácidos del mismo (SEC ID N° 23). Los péptidos señal se describen en cursiva. El ácido glutámico de doble línea (E) representa el residuo de aminoácido en N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de la CDR (subrayadas) se proporcionan de acuerdo con la definición de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Quinta edición, NIH Publicación No. 91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991). Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 del clon DI-2-14 VH se muestran en las SEC ID N° 30 a 32, respectivamente.

La Figura 22 muestra la secuencia de nucleótidos del ADNc (SEC ID N° 24) de la región variable de la cadena L (cadena ligera) (VL) del clon DI-2-14 y una supuesta secuencia de aminoácidos del mismo (SEC ID N° 25). Los péptidos señal se describen en cursiva. El ácido aspártico de doble línea (D) representa el residuo de aminoácido en N-terminal de un péptido maduro. Las secuencias de la CDR (subrayadas) se proporcionan de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991; como se ha descrito en lo que antecede). Las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la VL del clon DI-2-14 VH son como se muestra en las SEC ID N° 30 a 35, respectivamente.

La Figura 23 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 26) de un gen de VH del clon DI-2-14 y la secuencia de aminoácidos de la misma (SEC ID N° 27). Un sitio SpeI se añadió en el extremo 5' y un sitio HindIII se añadió en el extremo 3' (los dos sitios están subrayados). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva indica una secuencia correspondiente a un intrón..

La Figura 24 muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 28) de un gen de VL del clon DI-2-14 y la secuencia de aminoácidos de la misma (SEC ID N° 29). Un sitio NheI se añadió en el extremo 5' y un sitio EcoRI se añadió en el extremo 3' (los dos sitios están subrayados). La secuencia de nucleótidos descrita en cursiva indica una secuencia correspondiente a un intrón..

La Figura 25 es una vista esquemática de un vector de expresión del gen DI-2-14 quimérico de ratón-humano (pChDI-2-14) y vectores de expresión del gen DI-2-14 humanizados (pHuDI-2-14-1, pHuDI-2-14-2). En la dirección de las agujas del reloj a partir del sitio SalI, dicho vector comprende una unidad de traducción de la cadena pesada a partir de un promotor temprano inmediato principal del citomegalovirus humano (CMV) y un potenciador utilizado para la iniciación de la transcripción de un gen de la cadena pesada del anticuerpo. A continuación, la región CMV procede a un exón de VH, la secuencia génica de una región constante de la cadena pesada humana γ 1 (que comprende los exones de CH1, una región bisagra, CH2 y CH3, a través de intrones) y después de CH3, una porción poli A parte utilizada para el procesamiento del ARNm. Después de la secuencia del gen de la cadena pesada, el vector comprende una unidad de traducción de la cadena ligera a partir de un promotor de CMV y un potenciador y comprende además un exón VL, el exón (CL) de una región constante de la cadena κ humana que tiene una porción de intrón aguas arriba del mismo y la señal de poli A de un gen κ . A continuación, el gen de la cadena ligera procede a un segmento que comprende un promotor temprano de SV40, un gen de la xantina guanina fosforibosil transferasa (gpt) de E. coli y la porción de poli A de SV40. Por último, el plásmido tiene una parte de un plásmido pUC19 que comprende el origen de replicación de bacterias y un gen de la β -lactamasa.

La figura 26 muestra DI-2-14 (DI-2-14) de ratón y DI-2-14 (CHDI-2-14) quimérico de ratón-humano y DI-2-14 humanizado (Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2), que se desarrollaron mediante SDS-PAGE y después se tiñeron con CBB. PM indica un marcador de tamaño y las flechas indican los pesos moleculares de las bandas (kDa).

La Figura 27 muestra la actividad de unión al antígeno de cada uno de DI-2-14, 2-14-CHDI, Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi, que se midió mediante FA-1 purificada (región extracelular de hDlk-1) en ELISA en fase sólida. $\circ$ indica un anticuerpo IgG1 de ratón (clon DI-2-14), $\bullet$ indica un anticuerpo quimérico (CHDI-2-14), Δ indica un

anticuerpo humanizado (Hudi-2-14-1) y ▲ indica un anticuerpo humanizado (HuDI- 2-14-2).

La figura 28A muestra la reactividad de cada anticuerpo anti-hDlk-1 (DI-2-14, CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2) con células HEK293-hDlk-1 medida por citometría de flujo. Los histogramas rellenos indican los anticuerpos de control de isotipo (anticuerpos IgG1 de ratón). Los histogramas de línea en negro (abiertos) indican DI-2-14, CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2.

La figura 28B muestra la reactividad de cada anticuerpo anti-hDlk-1 (DI-2-14, CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2) con células SK-N-F1 medida por citometría de flujo. Los histogramas rellenos indican los anticuerpos de control de isotipo (anticuerpos IgG1 de ratón). Los histogramas de línea en negro (abiertos) indican DI-2-14, CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2.

La Figura 29 muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión de hDlk-1 de superficie celular en líneas celulares de cáncer de hígado humano por citometría de flujo. La línea azul indica IgG1 de ratón y la línea roja indica anticuerpo anti-hDlk-1. Estos son histogramas obtenidos por tinción cada tipo de células.

La Figura 30 muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión de hDlk-1 de superficie celular en líneas celulares de cáncer de mama humano por citometría de flujo. La línea azul indica IgG1 de ratón y la línea roja indica anticuerpo anti-hDlk-1. Estos son histogramas obtenidos por tinción cada tipo de células.

La Figura 31 muestra los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión de hDlk-1 de superficie celular en líneas celulares de leucemia humana por citometría de flujo. La línea azul indica IgG1 de ratón y la línea roja indica anticuerpo anti-hDlk-1. Estos son histogramas obtenidos por tinción cada tipo de células.

La Figura 32 muestra la inmunohistotinción de Flk-1 / VEGF-R2 en tejidos de cáncer extirpados de los modelos de tratamiento de xenoinjerto de células Huh-7-hDlk-1.

La Figura 32A incluye fotografías en las que las secciones congeladas frescas de tejidos de cáncer obtenidos (extirpados) de un grupo de administración de IgG de ratón (un grupo de control) y un grupo de administración del clon DI-2-14 se inmunotifieron con un anticuerpo anti-ratón Flk-1/VEGF-R2 (objetivo 200 x). En las fotografías, las porciones indicadas por la punta de la flecha (A) indican células endoteliales vasculares tumorales positivas a Flk-1 / VEGF-R2.

La Figura 32B es un gráfico, que se preparó mediante inmunotinción de las secciones congeladas frescas de tejidos de cáncer obtenidas (extirpadas) de un grupo de administración de IgG (2 individuos) y un grupo de administración DI-2-14 (4 individuos) con un anticuerpo Flk-1/VEGF-R2 anti-ratón, a continuación, y contando después el número de células endoteliales vasculares tumorales positivas a Flk-1 / VEGF-R2 en de 8 a 13 campos visuales (el grupo de administración de IgG: total de 21 de campos visuales, el grupo de administración de DI-2-14: total de 35 campos visuales) bajo una lente de objetivo de 200 veces y, a continuación, muestran el número de células por campo visual (* P <0,01 mediante prueba t de Student).

La Figura 33 muestra la expresión génica de Flk-1 / VEGF-R2 en tejidos de cáncer extirpados de los modelos de tratamiento de xenoinjerto de células Huh-7-hDlk-1.

La Figura 33A muestra una imagen electroforética, donde se extirpó el tumor de cada uno de un grupo de administración de IgG (N = 7) y un grupo de administración de DI-2-14 (N = 7), el ARN se extrajo después del tumor usando un reactivo Trizol, el ADNc de 1ª hebra se sintetizó a continuación y la expresión del gen Flk-1 / VEGF-R2 (mFlk-1) y / GAPDH de ratón/humana (GAPDH) se confirmó después mediante un método de PCR (30 ciclos) usando cada primera hebra de ADNc como molde. Con respecto a la gráfica inferior, una banda del producto de amplificación obtenido por PCR realizada en mFlk-1 y la GAPDH se cuantificó mediante imagen NIH y luego se expresó en la forma de una proporción (mFlk-1 / GAPDH).

La Figura 33B es una figura obtenida de la misma manera que en la Figura 33A anterior, con la excepción de que la reacción de amplificación se llevó a cabo durante 35 ciclos mediante el método de PCR.

La Figura 34 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 66) de la secuencia de la región variable de la cadena H de ratón ID-2-14 (DI-2-14 VH), las secuencias de aminoácidos (SEC ID N° 67 y 68, respectivamente) de dos tipos de secuencias de la región variable humanizada DI-2-14 H de la cadena H (Hudi-2-14 VH # 1 y Hudi-2-14 VH # 2) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 69 ; n° de acceso en GenBank AAA18279) de la región variable de la cadena H de un aceptor (n° de acceso en GenBank U00583) utilizado en la producción de anticuerpos humanizados (donde cada una de estas secuencias de aminoácidos es una porción de la secuencia de aminoácidos de cada región variable de la cadena H). El número indicado anteriormente de cada residuo de aminoácido se colocó de conformidad con la definición de Kabat et al. (1991). Lo subrayado indica una secuencia de la CDR como se determina de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991). El residuo de aminoácidos indicado por el doble subrayado se estima que se encuentra adyacente a dicha secuencia de CDR en términos de la estructura estérica. Por lo tanto, se considera que tal residuo de aminoácido retiene un residuo de aminoácido derivado de ratón en la misma posición en un anticuerpo humanizado. Las secuencias de CDR (---) de U00583 (no mostradas en la figura) representan específicamente CDR1 (SYAIS; SEC ID N° 79), CDR2 (GIPIFGTANYAQKFQG; SEC ID N° 80) y CDR3 (GDILTGLNWFDP; SEC ID N° 81), respectivamente, desde aguas arriba.

La Figura 35 muestra la alineación de la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 70) de la secuencia de la región variable de la cadena L de ratón ID-2-14 (DI-2-14 VL), la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 71) de la secuencia de la región variable de la cadena L de DI-2-14 humanizado (Hudi-2-14 VL) y la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 72; n° de acceso en GenBank CAA51135) de la región variable de la cadena L de un aceptor (n° de acceso en GenBank X72467) utilizado en la producción de anticuerpos humanizados (donde cada una de estas secuencias de aminoácidos es una porción de la secuencia de aminoácidos de la región

variable de la cadena L). El número indicado anteriormente de cada residuo de aminoácido se colocó de conformidad con la definición de Kabat et al. (1991). Lo subrayado indica una secuencia de la CDR como se determina de acuerdo con la definición de Kabat et al. (1991). El residuo de aminoácidos indicado por el doble subrayado se estima que se encuentra adyacente a dicha secuencia de CDR en términos de la estructura

estérica. Por lo tanto, se considera que tal residuo de aminoácido retiene un residuo de aminoácido derivado de ratón en la misma posición en un anticuerpo humanizado. Las secuencias de CDR (---) de X72467 (no mostradas en la figura) representan específicamente CDR1 (RSSQSLHLSNGYNYLD; SEC ID N° 82), CDR2 (LGSNRAS; SEC ID N° 83) y CDR3 (MQALQTPWT; SEC ID N° 84), respectivamente, desde aguas arriba.

La Figura 36A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 73) de un gen de VH n° 1 del clon DI-2-14 humanizado y la secuencia de aminoácidos del mismo (SEC ID N° 74). Los subrayados en ambos extremos representan las secuencias de los sitios de restricción añadidas a cada extremo. La secuencia de nucleótidos indicada en cursiva representa una secuencia de intrón..

La Figura 36B muestra las secuencias (SEC ID N° 73 y 74) de los genes de VH N° 1 DI-VH 2-14 humanizados y las posiciones de los cebadores de PCR.

La Figura 37A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 75) de un gen de VH n° 2 del clon DI-2-14 humanizado y la secuencia de aminoácidos del mismo (SEC ID N° 76). Los subrayados en ambos extremos representan las secuencias de los sitios de restricción añadidas a cada extremo. La secuencia de nucleótidos indicada en cursiva representa una secuencia de intrón..

La Figura 37B muestra las secuencias (SEC ID N° 75 y 76) de los genes de VH N° 2 DI-VH 2-14 humanizados y las posiciones de los cebadores de PCR.

La Figura 38A muestra la secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 77) de un gen de VL n° 1 del clon DI-2-14 humanizado y la secuencia de aminoácidos del mismo (SEC ID N° 78). Los subrayados en ambos extremos representan las secuencias de los sitios de restricción añadidas a cada extremo. La secuencia de nucleótidos indicada en cursiva representa una secuencia de intrón..

La Figura 38B muestra las secuencias (SEC ID N° 77 y 78) de los genes de VL DI-2-14 humanizados y las posiciones de los cebadores de PCR.

La figura 39 muestra la actividad DE ADCC de LOS anticuerpos DI-2-14 humanizados (Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2) y un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 quimérico de ratón-humano (CHDI-2-14). Las células SK-N-F1 que expresan endógenamente hDlk-1 en la superficie celular de las mismas se utilizaron como células diana. A las células SK-N-F1, cada uno de los controles negativos (IgG de ratón (IgG Mus) se añadieron 10 µg / ml; un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón DI-2-14 (IgG1), 10 µg / ml), un control positivo (anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón M1-290 (IgG2b), 10 µg / ml), CHDI-2-14 (10 µg / ml) y HuDI-2-14-1 and HuDI-2-14-2 (concentraciones de 0,01, 0,1, 1 y 10 µg / ml en todos los casos) y los monocitos de sangre periférica obtenidos de un donante sano. La mezcla se cultivó después durante 6 horas. A continuación se midió la actividad de LDH liberada en el sobrenadante de cultivo con el fin de medir la actividad ADCC. La figura muestra los resultados obtenidos (valor medio ± error estándar (N = 3)); □: efector / diana (E / T) = 20; ■: E/T = 40; **P < 0,05 mediante la prueba t de Student (comparación con la IgG Mus)).

La Figura 40 muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón (clon DI-2-14 (○; 20 mg / kg)) y un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 humanizado (Δ; Hudi-2 -14-2, 20 mg / kg), en los modelos de xenoinjerto de tratamiento utilizando células SK-N-F1 (neuroblastoma humano).

La Figura 40A muestra el crecimiento del tumor después del inicio de la administración de los anticuerpos (valor medio ± desviación estándar). * P < 0,01 (mediante prueba t de Student). La flecha indica el momento en que se administró cada anticuerpo.

La Figura 40B es un gráfico que muestra el peso de los tejidos de cáncer extirpados el Día 23 después de la administración de cada anticuerpo.

La Figura 41 muestra la actividad antitumoral de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi) y un anticuerpo IgG humano (control), en los modelos de xenoinjerto de tratamiento utilizando células HepG2 (una línea celular de cáncer de hígado que expresa hDlk-1 endógeno).

La Figura 41A muestra el crecimiento del tumor después del inicio de la administración de los anticuerpos (valor medio ± desviación estándar; * P < 0,01 mediante la prueba t de Student).

La Figura 41B es un gráfico que muestra el peso de los tejidos de cáncer extirpados el Día 9 después de la administración de los anticuerpos.

La Figura 42 muestra la actividad antitumoral de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi) y un anticuerpo IgG humano (control), en los modelos de xenoinjerto de tratamiento utilizando células SW480-hDlk-1 (una línea celular de cáncer de colon que expresa hDlk-1).

La Figura 42A muestra el crecimiento del tumor después del inicio de la administración de los anticuerpos (valor medio ± desviación estándar; * P < 0,01 mediante la prueba t de Student).

La Figura 42B es un gráfico que muestra el peso de los tejidos de cáncer extirpados el Día 28 después de la administración de cada anticuerpo.

La Figura 43 muestra la actividad antitumoral de un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 humanizado (Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi) y un anticuerpo IgG humano (control), en los modelos de xenoinjerto de tratamiento utilizando células Lu135 (una línea celular de cáncer de pulmón microcítico que expresa hDlk-1 endógeno).

La Figura 43A muestra el crecimiento del tumor después del inicio de la administración de los anticuerpos (valor medio ± desviación estándar; * P < 0,01 mediante la prueba t de Student).

La Figura 43B es un gráfico que muestra el peso de los tejidos de cáncer extirpados el Día 19 después de la administración de cada anticuerpo.

Descripción detallada de la invención

A continuación, la presente invención se describirá con mayor detalle.

5 1. Sumario de la presente invención

Como se ha descrito en lo que antecede, el Dlk-1 (homólogo 1 similar a delta (Drosophila)) humano, es una proteína transmembrana de tipo 1 (tipo transmembrana uno) con una longitud completa de 383 residuos de aminoácidos y esta proteína tiene 6 motivos de tipo EGF en su región extracelular. Se ha sabido que un gen hDlk-1 y un producto
10 génico del mismo se expresan con una alta frecuencia en diversos tipos de células cancerosas o tumorales. En general, es difícil de preparar y obtener un anticuerpo que presenta una actividad antitumoral in vivo. Por lo tanto, incluso si se produce un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1, tiene una actividad antitumoral in vitro, pero que no exhibe la actividad in vivo en muchos casos. Por otra parte, el dominio funcional de hDlk-1 que actúa sobre el
15 crecimiento de células cancerosas, un ligando (o un receptor) de hDlk-1, su vía de transducción de la señal intracelular y similares no se han aclarado. Por lo tanto, es sustancialmente imposible producir eficientemente un anticuerpo restringiendo su diana. En tales circunstancias, en la presente invención, los clones que tienen actividad antitumoral in vivo se han obtenido con éxito mediante el cribado de un gran número de clones.

En primer lugar, basado en inmunohistoquímica utilizando anticuerpos anti-hDlk-1 conocidos, los presentes
20 inventores han descubierto que hDlk-1 se expresa en el cáncer de colon y cáncer de mama, además de los cánceres mencionados anteriormente y las células tumorales, en los que la expresión de hDlk-1 se había confirmado previamente.

A continuación, los presentes inventores han producido recientemente aproximadamente 100 clones de anticuerpos
25 monoclonales anti-hDlk-1 con el fin de producir anticuerpos anti-hDlk-1 capaces de matar las células cancerosas que expresan hDlk-1 a nivel individual o inhibir el crecimiento del tumor, a saber, anticuerpos anti-hDlk-1 que tienen actividad antitumoral in vivo. Después, los inventores han evaluado los efectos farmacéuticos in vivo (actividad antitumoral) de estos clones, utilizando ratones portadores de tumores establecidos mediante el trasplante de
30 diversos tipos de líneas celulares de cáncer por vía subcutánea en ratones atímicos. Como resultado, los presentes inventores han tenido éxito en la obtención de varios clones que presentan una actividad significativa inhibidora del crecimiento tumoral (nombre del clon: DI-2-14, 2-13, BA-1-3D, DI-6 y M3-1).

Además, entre los anti-hDlk-1 mencionados anteriormente, los presentes inventores han encontrado un anticuerpo
35 excelente en términos de capacidad migratoria para introducirse en las células que expresan hDlk-1 (actividad de internalización) y los inventores han producido un complejo anticuerpo-agente, que comprende un anticuerpo tal y un compuesto que tiene una actividad antitumoral o actividad de destrucción celular. Este complejo es lo que se llama un "inmunoconjugado", que es excelente en términos de capacidad para liberar agentes en las células tumorales diana.

Los presentes inventores han encontrado que el anticuerpo anti-hDlk-1 o el complejo anticuerpo-agente
40 mencionados anteriormente que tiene una actividad anti-tumor son útiles para el tratamiento de diversos tipos de tumores, o para el diagnóstico y la detección de tumores.

45 2. Preparación del anticuerpo anti-hDlk-1

(1) Preparación del antígeno

La información relativa a la secuencia de aminoácidos (SEC ID N° 2) de hDlk-1 se divulga como "número de acceso:
50 NP_003827" en el sitio web del NCBI (GenBank) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por ejemplo. Además, la información con respecto a una secuencia de nucleótidos (SEC ID N° 1) que codifica la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 se divulga como "número de acceso: NM_003836" en el mismo sitio web anterior.

Como un antígeno, un polipéptido o péptido (que puede denominarse simplemente "péptido" a veces) que
55 comprende al menos una porción de (toda o una parte de) la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 puede usarse y, preferentemente, se puede usar un péptido que comprende al menos una porción de (toda o una parte de) la secuencia de aminoácidos de la región extracelular (FA-1) de hDlk-1. Como se ha indicado anteriormente, la región extracelular de hDlk-1 comprende 6 motivos de tipo EGF (EGF-1 a EGF-6). Esta región indica una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 26 a 244 en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC
60 ID N° 2 y preferentemente una región consiste en los aminoácidos de "posición 24" a las "posiciones 248-285" (aproximadamente de 225 a 262 residuos de aminoácidos) en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEC ID N° 2.

En el presente documento, en el caso de un péptido usado como un antígeno, la longitud de la "al menos una
65 porción de la secuencia de aminoácidos" mencionada anteriormente no está particularmente limitada. Por ejemplo, una región que comprende uno o dos o más de los 6 motivos de tipo EGF es preferible. Ejemplos más preferibles incluyen una región que comprende EGF-1 y EGF-2 (es decir, una región que consiste en los aminoácidos en las

posiciones 26 a 85 en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 2), una región que comprende EGF-3 y EGF-4 (a saber, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 92 a 167 en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 2) y una región que comprende EGF-4, EGF-5 y EGF-6 (es decir, una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 131 a 244 en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 2).

Como método para preparar un péptido usado como un antígeno, se puede aplicar una síntesis química o una síntesis por ingeniería genética utilizando *Escherichia coli* o similar. Se pueden aplicar métodos bien conocidos para las personas expertas en la técnica.

En el caso de realizar una síntesis química de péptidos, tal péptido se puede sintetizar por métodos bien conocidos para sintetizar péptidos. Como tal síntesis, se puede aplicar un método de síntesis en fase sólida o un método de síntesis en fase líquida. Se pueden utilizar aparatos de síntesis de péptidos comercialmente disponibles (p. ej., PSSM-8, etc., fabricado por Shimadzu Corp.).

En el caso de la síntesis de un péptido mediante ingeniería genética, el ADN que codifica el péptido se diseña primero y se sintetiza. El diseño y la síntesis del ADN pueden llevarse a cabo, por ejemplo, mediante un método de PCR, usando un vector que comprende un gen de hDlk-1 de longitud completa o similares como molde y también usando cebadores diseñados de tal manera que se pueda sintetizar una región de ADN deseada. Desales, el ADN sintetizado de este modo se liga a un vector adecuado para obtener un vector recombinante utilizado en la expresión de una proteína. Este vector recombinante se introduce a continuación en un huésped de tal manera que se pueda expresar un gen de interés en el mismo, a fin de obtener un transformante (Sambrook J. et al., *Molecular Cloning*, A Laboratory Manual, 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001).

Como vector se puede usar un fago o plásmido capaz de replicarse de forma autónoma en microorganismos huésped. Además, también se pueden utilizar un vector de virus animal o de virus de insecto. Para la preparación de un vector recombinante, el ADN purificado se puede escindir con enzimas de restricción adecuadas, la porción de ADN obtenido puede insertarse después en el sitio de restricción del ADN vector adecuado, etc., y puede ligarse después en un vector. El tipo de un huésped utilizada en la transformación no está particularmente limitado, con tal de que sea capaz de expresar un gen de interés. Ejemplos de un huésped de este tipo incluyen bacterias (*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, etc.), levaduras, células animales (células COS, células CHO, etc.), células de insecto e insectos. También es posible utilizar como huésped un mamífero, tal como una cabra. Se conoce un método para introducir un vector recombinante en un huésped.

Se cultiva el transformante mencionado anteriormente y un péptido utilizado como antígeno se recoge después del cultivo. El término "cultivo" se usa para querer decir uno cualquiera de (a) un sobrenadante de cultivo y (b) células cultivadas, una masa de células cultivadas, o un producto disgregado de los mismos.

Después de finalizado el cultivo, cuando un péptido de interés se produce en una célula bacteriana (cuerpos bacterianos) o en células, tales células bacterianas o células se desintegran y un péptido se extrae a continuación. Por otra parte, se produce un péptido de interés fuera de las células bacterianas o células, una solución de cultivo se utiliza directamente, o las células bacterianas o células se eliminan por centrifugación o similar. A continuación, los métodos bioquímicos comunes utilizados en el aislamiento y la purificación de los péptidos, tales como precipitación con sulfato de amonio, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad, se aplican individualmente o en combinación, con el fin de aislar y purificar un péptido de interés.

En la presente invención, un péptido utilizado como antígeno también se puede obtener mediante traducción in vitro utilizando un sistema de síntesis sin células. En este caso, se pueden aplicar dos tipos de métodos, a saber un método que utiliza ARN como molde y un método que utiliza el ADN como molde (transcripción / traducción). Como un sistema de síntesis sin células se pueden usar sistemas disponibles en el mercado tales como el sistema Expressway™ (Invitrogen), PURESYSYSTEM (marca registrada Post Genome Institute Co., Ltd.) y el sistema TNT (marca registrada, Promega).

El péptido obtenido de este modo también puede estar unido a una proteína transportadora adecuada, tal como seroalbúmina bovina (BSA), hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina humana o gamma globulina de pollo.

Además, dicho antígeno puede ser un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o múltiples aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 (SEC ID N° 2) o la secuencia parcial de la misma mencionada anteriormente. Por ejemplo, también se puede utilizar un péptido, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una delección de uno o múltiples (preferentemente uno o varios (por ejemplo de 1 a 10 y más preferentemente de 1 a 5)) aminoácidos, una sustitución de uno o múltiples (preferentemente uno o varios (por ejemplo 1 a 10 y más preferentemente de 1 a 5)) aminoácidos con otros aminoácidos, o una adición de uno o múltiples (preferentemente uno o varios (por ejemplo 1 a 10 y más preferentemente 1 a 5)) aminoácidos, con respecto a la secuencia de aminoácidos de hDlk-1 o una secuencia parcial de la misma.

En la presente invención, un ejemplo de un gen que se va a introducir en las células o similares es un gen que codifica una proteína hDlk-1, un fragmento parcial de la misma, una proteína mutante de la misma, o un fragmento de la misma. Como tal gen, se puede usar un gen que tiene la secuencia de nucleótidos como se muestra en la SEC ID N° 1 o una secuencia parcial de la misma, por ejemplo.

Además, como tal gen a introducir en las células o similares, también se puede usar una secuencia de nucleótidos, que se hibrida con una secuencia complementaria a la secuencia de nucleótidos como se muestra en SEC ID N° 1 en condiciones rigurosas y codifica una proteína que tiene actividad hDlk-1 o una secuencia parcial de la misma.

El término "condiciones rigurosas" se usa para querer decir condiciones aplicadas al lavado después de la hibridación, que consisten en una concentración en sal (de sodio) del tampón de entre 10 y 500 mM y una temperatura entre 42 °C y 72 °C y, preferentemente, consiste en la concentración en sal del tampón mencionada anteriormente de entre 50 y 300 mM y una temperatura entre 55 °C y 68 °C.

La mutación puede introducirse en un gen por métodos conocidos tales como un método Kunkel o un método dúplex Gapped utilizando kits de introducción de la mutación que utilizan mutagénesis dirigida al sitio, tal como GeneTailor™ Sistema de mutagénesis dirigida al sitio (fabricado por Invitrogen) o TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (fabricado por Invitrogen) o TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K, Mutan-Super Express Km, etc.; fabricado por Takara Bio Inc.).

(2) Preparación del anticuerpo policlonal

El antígeno preparado se administra a un mamífero para la inmunización. El tipo de un mamífero de este tipo no está particularmente limitado. Ejemplos de un mamífero de este tipo incluyen una rata, un ratón y un conejo. Entre otros, un ratón es preferible.

La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. Ejemplos de un adyuvante de este tipo incluyen adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA) y adyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización puede llevarse a cabo mediante la inyección del antígeno en la vena, la almohadilla plantar, el tejido subcutáneo, la cavidad abdominal, etc. Además, el intervalo de inmunización no está particularmente limitado. La inmunización se lleva a cabo de 1 a 10 veces y, preferentemente, 2 o 3 veces, a intervalos de varios días a varias semanas y, preferentemente, a intervalos de 1 semana. De tres a siete días después de la inmunización final, un título de anticuerpo se mide mediante inmunoensayo enzimático (ELISA o EIA), radioinmunoensayo (RIA), etc. En el día en que se obtiene un título de anticuerpo deseado, se recoge sangre y después se obtiene el antisero. En un caso donde un anticuerpo debe purificarse en el método mencionado anteriormente para recoger el anticuerpo, un método adecuado se selecciona apropiadamente de los métodos conocidos tales como un método de desalado con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel y cromatografía de afinidad, o estos métodos pueden utilizarse en combinación, para purificar el anticuerpo. A continuación, la reactividad de un anticuerpo policlonal contenido en el antisero se mide por ELISA, etc.

(3) Preparación del anticuerpo monoclonal

(3-1) Recolección de células productoras de anticuerpos

El tipo de anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención no está limitado. Es preferible un anticuerpo monoclonal.

El antígeno preparado se administra a un mamífero tal como una rata, un ratón o un conejo para la inmunización. La dosis del antígeno por animal se puede determinar, según sea apropiado, dependiendo de la presencia o ausencia de un adyuvante. Los mismos adyuvantes que los descritos anteriormente se utilizan en el presente documento. Además, los mismos métodos de inmunización que se han descrito anteriormente se aplican en el presente documento. Las células productoras de anticuerpos se recogen de uno a sesenta días y, preferentemente, de uno a catorce días después de la inmunización final. Ejemplos de tales células productoras de anticuerpos incluyen células del bazo, células de los ganglios linfáticos y células de sangre periférica. Entre otras son preferibles las células de los ganglios linfáticos y las células esplénicas.

(3-2) Fusión celular

A fin de obtener un hibridoma (una línea celular productora de anticuerpos), la fusión celular se lleva a cabo entre las células productoras de anticuerpos y las células de mieloma. Como células de mieloma a fusionar con las células productoras de anticuerpos se pueden usar líneas celulares establecidas fácilmente disponibles, como las líneas de células de animales tales como ratones. Como líneas celulares disponibles son preferibles aquellas que tienen la selectividad de fármacos no pueden sobrevivir en un medio selectivo HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) cuando están en un estado no fusionado y pueden sobrevivir en ellos sólo cuando se fusionan con las células productoras de anticuerpos.

Ejemplos de células de mieloma utilizadas en el presente documento incluyen líneas celulares de mieloma de ratón, tales como P3-X63-Ag8.653, P3-X63-Ag8(X63), P3-X63-Ag8.U1(P3U1), P3/NS I/1-Ag4-1(NS1) y Sp2/0-Agl4(Sp2/0). Tales células de mieloma se pueden seleccionar teniendo en cuenta la compatibilidad con las células productoras de anticuerpos, según corresponda.

Posteriormente, las células de mieloma se fusionan con las células productoras de anticuerpos para la fusión celular. Para tal fusión celular, las células productoras de anticuerpos a una densidad celular de 1×10^6 a 1×10^7 células / ml se mezclan con células de mieloma a una densidad celular de 2×10^5 a 2×10^6 células / ml, en un medio utilizado para células animales que no contiene suero, tales como medios DMEM o RPMI-1640. La proporción de células entre dichas células productoras de anticuerpos y tales células de mieloma (células productoras de anticuerpos: células de mieloma) no está limitada. En general, dicha relación tal célula está preferentemente entre 1: 1 y 10: 1 y, más preferentemente, 3: 1. Posteriormente, se lleva a cabo una reacción de fusión en presencia de un promotor de la fusión celular. Como tal promotor de la fusión celular se puede usar polietilenglicol que tiene un peso molecular medio entre 1.000 y 6.000 daltons (Da) o similares, por ejemplo. Además, las células productoras de anticuerpos se pueden fusionar con células de mieloma usando un dispositivo de fusión celular disponible comercialmente que utiliza estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación).

(3-3) Selección de hibridoma y clonación

Los hibridomas de interés se seleccionan a partir de células obtenidas después del tratamiento de fusión celular. Como método de selección, una suspensión celular se diluye con un medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal o similar, según sea apropiado, y la solución diluida se dispersa a continuación en una placa de microtitulación. Se añade un medio selectivo a cada pocillo y a continuación se lleva a cabo el cultivo, mientras que el medio selectivo se cambia apropiadamente por uno fresco. Como resultado, las células que crecen aproximadamente 14 días después del inicio del cultivo en el medio selectivo pueden obtenerse como hibridomas.

Posteriormente, se seleccionó la presencia o ausencia de un anticuerpo contra hDlk-1 en un sobrenadante de cultivo de los hibridomas en crecimiento. Dicho cribado de los hibridomas se puede llevar a cabo de acuerdo con métodos ordinarios y por lo tanto el tipo del método de selección no está particularmente limitado. Por ejemplo, se puede recoger una porción del sobrenadante del cultivo de los hibridomas en crecimiento contenidos en el pocillo y dichos hibridomas se pueden seleccionar mediante ELISA, EIA, RIA, etc.

Las células fusionadas se pueden clonar mediante dilución límite o similar. Un anticuerpo que presenta una fuerte reactividad con hDlk-1 se determina mediante citometría de flujo o similar, y un hibridoma que produce el anticuerpo se selecciona y se establece como un clon.

(3-4) Recolección del anticuerpo monoclonal

Como método de cultivo de los hibridomas establecidos y la recolección posterior de un anticuerpo monoclonal a partir del cultivo obtenido se puede adoptar un método de cultivo celular común, un método de formación de ascitis, etc. El término "cultivo" se usa para querer decir que se permite que un hibridoma crezca en una placa de cultivo o un frasco de cultivo o se deja que un hibridoma prolifere en la cavidad abdominal de un animal, tal como se describe a continuación.

En el método de cultivo celular, los hibridomas pueden cultivarse en un medio de cultivo celular animal, tal como un medio RPMI-1640 que contiene 10 % de suero bovino fetal, un medio MEM o un medio sin suero en condiciones de cultivo comunes (por ejemplo, 37 °C, concentración de 5 % de CO₂) durante 7 a 14 días y después puede obtenerse un anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo.

En el método de formación de ascitis, los hibridomas se administran a una densidad celular de aproximadamente 1×10^7 células en la cavidad abdominal de un animal de la misma especie como un mamífero del que se derivan las células de mieloma, con el fin de provocar la proliferación de una gran cantidad de hibridomas. A continuación, la ascitis se recoge preferentemente de 2 a 3 semanas más tarde.

En un caso donde un anticuerpo debe purificarse en el método mencionado anteriormente para recoger el anticuerpo, un método adecuado se selecciona apropiadamente de los métodos conocidos tales como un método de desalado con sulfato amónico, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad, o estos métodos pueden utilizarse en combinación, para purificar el anticuerpo mencionado anteriormente.

(3-5) Selección del clon que tiene actividad antitumoral

Los anticuerpos anti-hDlk-1 de la presente invención son anticuerpos que tienen actividad antitumoral in vivo.

En el presente documento el término "actividad antitumoral" se utiliza para significar una actividad de destrucción de células tumorales (células cancerosas) o de inhibición del crecimiento tumoral. En la presente invención, como tal actividad antitumoral, es preferible una actividad de inhibición de la angiogénesis tumoral, por ejemplo. Por otra

parte, los tipos de tumores humanos (células tumorales), donde el anticuerpo de la presente invención es capaz de exhibir actividad antitumoral, incluyen: los tumores humanos conocidos mencionados anteriormente en los que la expresión de hDlk-1 se había confirmado (específicamente, cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y cáncer de ovarios, y cánceres de la sangre tales como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mielocítica aguda); y el cáncer de colon humano y el cáncer de mama humano en los que la expresión de hDlk-1 la han confirmado recientemente los presentes inventores. De estos, uno o dos o más tipos seleccionados de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neuroblastoma humano son particularmente preferibles.

La presencia de una actividad antitumoral in vivo se puede confirmar mediante el uso de un ratón portador de cáncer, donde se han transplantado células tumorales por vía subcutánea y, a continuación, la administración del anticuerpo obtenido al ratón. En este caso, el anticuerpo se puede administrar al ratón inmediatamente después del trasplante de las células tumorales (un modelo de prevención), o el anticuerpo también se puede administrar al ratón después de que el tumor ha crecido hasta un volumen deseado después del trasplante (un modelo de tratamiento). Un método de administración no está limitado. Por ejemplo, el anticuerpo se puede administrar en la cavidad abdominal del ratón una vez cada 3 días a una dosis de 20 mg / kg de peso corporal a través de la administración intraperitoneal. En el caso del modelo de prevención, la presencia o ausencia de una actividad antitumoral y el nivel de la misma pueden evaluarse en función de la frecuencia de formación de tumor y del volumen del tumor. En el caso del modelo de tratamiento, la presencia o ausencia de una actividad antitumoral y el nivel de la misma pueden evaluarse en función del volumen del tumor.

En la presente invención, los ejemplos preferidos de un anticuerpo anti-hDlk-1 que tiene una actividad antitumoral in vivo incluyen: un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (nombre del clon: DI-2-14) producido por un hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-10899. Además, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 con un nombre de clon de DI-2-14 se puede utilizar preferentemente como anticuerpo que tiene una alta actividad antitumoral in vivo.

En el presente documento, el hibridoma que tiene el nº de acceso FERM BP-10707 se ha denominado "hibridoma de ratón-ratón: M3-1," y se ha depositado en el Depósito de Organismos de Patentes internacionales (IPOD), Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, (AIST Tsukuba Central de 6, Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, código postal: 305-8566), el 18 de octubre de 2006. El hibridoma que tiene el número de acceso FERM BP-10899 se ha denominado "hibridoma ratón-ratón DI-2-14", y se ha depositado en el mismo instituto nacional anterior el 21 de agosto de 2007. El hibridoma que tiene el número de acceso FERM BP-10900 se ha denominado "hibridoma Ratón-Ratón DI-6", y se ha depositado en el mismo instituto nacional anterior el 21 de agosto 2007.

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención incluye las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H son las secuencias de aminoácidos que se muestran en las SEC ID N° 30 a 32, respectivamente, y / o un anticuerpo anti-hDlk-1 donde las secuencias de aminoácidos de las CDR 1 a 3 de la región V de cadena L son las secuencias de aminoácidos como se muestran en las SEC ID N° 33 a 35, respectivamente. La región V de la cadena H mencionada anteriormente consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 23 y la región V de la cadena L antes mencionada consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 25.

Aún más, otro ejemplo preferido del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención es un anticuerpo anti-hDlk-1 que se une a un sitio (por ejemplo, un epítipo), a la que se une (reconoce) un anticuerpo monoclonal producido por el hibridoma que tiene el No. de adhesión FERM BP-10899.

(3-6) Epítipo del anticuerpo anti-hDlk-1

Un epítipo (un determinante antigénico) del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención no está limitado, siempre y cuando sea al menos una porción de hDlk-1 como antígeno. Por ejemplo, dicho epítipo tal es preferentemente al menos una porción de una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 26 a 85 (una región que comprende EGF-1 a EGF-2 de hDlk-1), una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 92 a 167 (una región que comprende EGF-3 a EGF-4 de hDlk-1), o una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 131 a 244 (una región que comprende EGF-4 a EGF-6 de hDlk-1), en el secuencia de aminoácidos de hDlk-1 como se muestra en la SEC ID N° 1. Entre otros, son más preferibles una región que comprende EGF-4 a EGF-6 y una región que comprende EGF-4 a EGF-6 de hDlk-1. Una región que consiste en los aminoácidos en las posiciones 92 a 120 (una región que comprende EGF-3 de hDlk-1) es particularmente preferible. Un anticuerpo anti-hDlk-1 que reconoce (se une a) dichas regiones tiene una alta actividad de la internalización en las células tumorales, por ejemplo, y por lo tanto, es extremadamente útil como un inmunoconjugado tal como se describe más adelante.

(4) Anticuerpo recombinante genéticamente y fragmento de anticuerpo

(4-1) Anticuerpo recombinante genéticamente

En una forma de realización preferida del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención, se proporciona un anticuerpo recombinante genéticamente. El tipo de dicho anticuerpo tal genéticamente recombinante no está limitado. Ejemplos incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano.

Un anticuerpo quimérico (es decir, un anticuerpo quimérico humanizado) es un anticuerpo formado por enlace (conjugación) de la región variable de un anticuerpo derivado de ratón con la región constante de un anticuerpo derivado de ser humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 81, 6851 a 6855, (1984), etc.). Cuando se produce un anticuerpo quimérico de este tipo, el anticuerpo enlazado de este modo puede construirse fácilmente mediante una técnica de recombinación genética. Como tales regiones variables del anticuerpo derivado de ratón usadas en el presente documento, la región V de la cadena H consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 23, por ejemplo, y la región V de la cadena L consiste preferentemente en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 25, por ejemplo.

Cuando se produce un anticuerpo humanizado, una región determinante de la complementariedad (CDR) se trasplanta desde la región variable de un anticuerpo de ratón en la región variable de un anticuerpo humano, a fin de producir una región variable reconstruida, donde una región marco (FR) se deriva del ser humano y la CDR se deriva de la del ratón (lo que se denomina injerto de CDR (trasplante de CDR)). Posteriormente, la región variable reconstruida humanizada de este modo se enlaza con una región constante humana. Como tal región variable humana reconstruida humanizada, una región V de la cadena H preferentemente consiste en, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 74 (que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 67 como una porción del mismo) o la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 76 (que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 68 como una parte del mismo). Una región V de la cadena L consiste preferentemente, en, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 78 (que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 71 como una parte de la misma). Tal método para producir un anticuerpo humanizado es bien conocido en el presente campo técnico (consulte Nature, 321, 522-525 (1986); J. Mol. Biol., 196, 901-917 (1987); Queen C et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033 (1989); publicación de patente japonesa (Kohyo) N° 4-502408 A (1992) (n° de patente japonesa 2828340; Queen et al.), etc.). Las secuencias de aminoácidos como se muestra en las SEC ID N° 30 a 32 son las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H (en este orden) y las secuencias de aminoácidos como se muestra en SEC ID N° 33 a 35 son las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L (en este orden). En el presente documento, en la región variable humana reconstruida humanizada, las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena H como se muestra en las SEC ID N° 74 o 76 son, respectivamente, una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 50 a 54 (CDR1), una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 69 a 85 (CDR2) y una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 118 a 125 (CDR3), en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 74 o 76. Asimismo, las CDR 1 a 3 de la región V de la cadena L como se muestra en la SEC ID N° 78 son, respectivamente, una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 44 a 59 (CDR1), una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 75 a 81 (CDR2) y una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 114 a 122 (CDR3), en la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 78.

En general, en el caso de un anticuerpo humano (un anticuerpo humano completo), su estructura que comprende una región hipervariable que es el sitio de unión a antígeno de una región V, otras partes de la región V y una región constante es la misma que la estructura del anticuerpo de un ser humano. Sin embargo, dicho sitio hipervariable también puede derivarse de otros animales. Una técnica de producción de un anticuerpo humano se conoce públicamente y se ha establecido un método para la producción de secuencias de genes que son habituales en los seres humanos mediante ingeniería genética. Un anticuerpo humano se puede obtener, por ejemplo, mediante un método que utiliza un ratón productor de anticuerpos humanos que tiene fragmentos cromosómicos humanos que comprenden los genes de la cadena de la cadena H y la cadena L del anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. et al., Nature Genetics, (1977) 16, 133-143; Kuroiwa, Y. et. al., Nuc. Acids Res., (1998) 26, 3447-3448; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects, (1999) 10, 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (2000) 97, 722-727, etc.), o mediante un método de obtención de un anticuerpo humano derivado de expresión en fagos seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (consúltese Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science., (2002) 43 (7), 2301-8; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics, (2002) 1 (2), 189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology, (2002) 109 (3), 427-431, etc.).

En el caso del anticuerpo quimérico mencionado anteriormente, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humano, la cadena de azúcar ligada a N-glicósido en la región Fc del anticuerpo es preferentemente una cadena de azúcar, donde la fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de la misma. Un ejemplo específico es un anticuerpo que consiste en moléculas de anticuerpos recombinantes genéticamente, que tiene, en la región Fc de las moléculas de anticuerpo, una cadena de azúcar donde la posición 1 de la fucosa no se une a la posición 6 de la N-acetilglucosamina en el terminal reductor de la cadena de azúcar unida a N-glicósido a través de un enlace α . Dicho anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad ADCC. Este punto (las características de la cadena de azúcar ligada a N-glicósido en la región Fc de anticuerpos), es preferible también para el anticuerpo policlonal y el anticuerpo monoclonal mencionado anteriormente.

(4-2) Fragmento de anticuerpo

El fragmento de anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención está incluido en el anticuerpo de la presente invención. En el presente documento, el fragmento de anticuerpo de la presente invención tiene actividad de unión a hDlk-1 y actividad antitumoral in vivo, como en el caso del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención.

El fragmento del anticuerpo significa una región de una porción de un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1 o un anticuerpo monoclonal anti-DLK-1 (a saber, un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención). Ejemplos de un fragmento de anticuerpo de este tipo incluyen péptidos que comprenden, como al menos una porción de los mismos, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv (fragmento variable del anticuerpo), un anticuerpo de cadena sencilla (una cadena H, una cadena L, una región V de la cadena H y una región V de cadena L, etc.), scFv, diacuerpo (scFv dímero), dsFv (una región V estabilizada con disulfuro) y una región determinante de la complementariedad (CDR).

El Fab es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene una actividad de unión al antígeno, que se forma mediante la unión de aproximadamente la mitad del extremo N de la cadena H y toda la cadena L a través de un enlace disulfuro, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de moléculas de anticuerpo con una proteasa, papaína. Además, también es posible producir tal Fab mediante la inserción de ADN que codifica el Fab de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 100.000 que tiene una actividad de unión al antígeno, cuyo tamaño es ligeramente mayor que el del Fab que se une a Fab a través de un enlace disulfuro en la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos por tratamiento de las moléculas de anticuerpo con una proteasa, pepsina. Además, también es posible producir tal F(ab')₂ mediante el enlace tioéter o disulfuro de Fab, tal como se describe más adelante.

Fab' es un fragmento de anticuerpo con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que tiene una actividad de unión al antígeno, que se forma por escisión del enlace disulfuro en la región bisagra del F(ab')₂ mencionado anteriormente. Además, también es posible producir tal Fab' mediante la inserción de ADN que codifica el fragmento Fab' de un anticuerpo en un vector de expresión procariota o un vector de expresión eucariota e introduciendo después el vector en un procariota o un eucariota para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

scFv es un fragmento de anticuerpo que tiene una actividad de unión al antígeno, que es un polipéptido VH-P-VL o VL-VH-P formado por ligación de una región V de la cadena H sencilla (VH) a una región V de la cadena L sencilla (VL) utilizando un conector peptídico apropiado (P). Tal scFv puede producirse obteniendo ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas y a continuación introduciendo el vector en un procariota o un eucariota así como para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

El diacuerpo es un fragmento de anticuerpo formado por dimerización de scFv, que tiene actividades de unión a antígeno divalentes. Tales actividades de unión a antígeno divalentes pueden ser idénticas entre sí, o también pueden ser diferentes unas de otras. Tal diacuerpo puede producirse obteniendo ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica scFv, de forma que la longitud de la secuencia de aminoácidos de P es de 8 residuos o menos, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas y a continuación introduciendo el vector en un procariota o un eucariota así como para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

dsFv es un fragmento de anticuerpo formado uniendo polipéptidos, en los que un residuo de aminoácido en cada una de VH y VL ha sido sustituido por un residuo de cisteína, entre sí o a través de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. El residuo aminoácido que se va sustituir con los residuos de cisteína puede seleccionarse basándose en la estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo de acuerdo con el método de Reiter et al. (Protein Engineering, 7, 697-704, 1994). Tal dsFv puede producirse obteniendo ADNc que codifican la VH y la VL de un anticuerpo, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas y a continuación introduciendo el vector en un procariota o un eucariota así como para permitir que el ADN se exprese en el mismo.

Un péptido que comprende CDR comprende las tres regiones de CDR (CDR 1 a 3) de VH y VL. Diversos péptidos que comprenden una CDR se pueden unir entre sí, directamente o mediante un enlazador peptídico adecuado. Tal péptido que comprende CDR puede producirse construyendo ADN que codifica la VH y la VL de un anticuerpo, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas y a continuación introduciendo el vector de expresión en un procariota o un eucariota así como para permitir que el ADN se exprese en el mismo. Además, un péptido de este tipo que comprende CDR también puede producirse mediante métodos de síntesis química tal como un método Fmoc (un método de fluorenilmetiloxycarbonilo) y un método tBoc (un método t-butiloxycarbonilo).

El fragmento de anticuerpo de la presente invención, como tal, puede ser un fragmento de anticuerpo, que comprende una parte o la totalidad de la región Fc del anticuerpo donde fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de una cadena de azúcar ligada a N-glicósido.. Por el contrario, el fragmento de anticuerpo de la presente invención también puede ser una proteína de fusión, donde el fragmento de anticuerpo mencionado anteriormente se fusiona con parte o la totalidad de la región Fc del anticuerpo donde fucosa no se une a N-acetilglucosamina en el terminal reductor de una cadena de azúcar ligada a N-glicósido.. Tal fragmento de anticuerpo es capaz de mejorar significativamente la actividad de ADCC y, por lo tanto, es preferible.

El tipo del fragmento de anticuerpo de la presente invención no está limitado, siempre que el fragmento comprenda la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H mostrada en las SEC ID N° 67 o 68 y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L mostrada en la SEC ID N° 71.

En lo sucesivo, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, los fragmentos de anticuerpos mencionados anteriormente también están incluidos en el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención.

3. Preparación del complejo de anticuerpo-agente

Como un inmunoconjugado preparado usando el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención mencionado anteriormente, se puede proporcionar un complejo anticuerpo-agente, que comprende el anticuerpo mencionado anteriormente y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y / o una actividad de destrucción celular. Cabe señalar que un complejo formado previamente mediante la preparación de cada una de las moléculas de anticuerpo mencionadas anteriormente y el compuesto mencionado anteriormente que tiene una actividad antitumoral y / o una actividad de destrucción celular, por separado y después combinándolas, se conoce en general como inmunoconjugado. Por otro lado, un complejo obtenido ligando una toxina de proteína utilizada como dicho compuesto que tiene una actividad antitumoral y / o una actividad de destrucción celular a un gen de anticuerpo en un gen de acuerdo con una técnica de recombinación genética, a fin de permitir que se exprese como una sola proteína (una proteína de fusión), se denomina generalmente inmunotoxina.

Ejemplos de un compuesto que tiene actividad antitumoral incluyen doxorubicina, caliqueamicina, mitomicina C y auristatina E.

Ejemplos de un compuesto que tiene actividad de destrucción celular incluyen saporina, lisina, exotoxina de *Pseudomonas* y toxina de la difteria. De éstos, se utilizan preferentemente saporina y la exotoxina de *pseudomonas*.

Un método para producir un complejo de anticuerpo-agente no está limitado. Por ejemplo, se aplica un método de acoplamiento de un anticuerpo con un agente a través de un enlace disulfuro o un enlace hidrazona.

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención mencionado anteriormente es excelente en términos de una actividad internalización en las células tumorales diana que expresan hDlk-1. Por lo tanto, mediante la combinación previa de un compuesto que tiene una actividad antitumoral y / o una actividad de destrucción celular con el anticuerpo anti-hDlk-1 se hace posible permitir que un compuesto de este tipo actúe directamente y altamente selectiva sobre las células tumorales. El complejo anticuerpo-agente de la presente invención es extremadamente excelente en términos de capacidad de liberar agente en las células tumorales diana.

La actividad de la internalización en las células se puede evaluar mediante marcaje fluorescente de un anticuerpo con rodamina o similar y observar después el comportamiento migratorio y la localización del anticuerpo utilizando un microscopio de fluorescencia o similar.

Además, en la presente invención, además del complejo anticuerpo-agente mencionado anteriormente, también se puede proporcionar un complejo de fragmento de anticuerpo-agente, donde el fragmento de anticuerpo antes mencionado se utiliza en lugar de un anticuerpo. Con respecto a los detalles de tal complejo de fragmento de anticuerpo-agente, las descripciones del complejo anticuerpo-agente mencionado anteriormente se pueden aplicar, según sea apropiado.

En lo sucesivo, en las descripciones de la presente memoria descriptiva, dicho complejo de fragmento de anticuerpo-agente está también incluido en el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención.

4. Composición farmacéutica

El anticuerpo anti-hDlk-1 y el complejo anticuerpo-agente de la presente invención son útiles como ingredientes activos contenidos en una composición farmacéutica.

La composición farmacéutica es útil como composición farmacéutica para el tratamiento y / o diagnóstico de un tumor. En particular, ya que el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención y un complejo de anticuerpo-agente que comprende el anticuerpo antes mencionado tienen una actividad inhibidora de la angiogénesis tumoral como tal actividad antitumoral, se utilizan preferentemente en el tratamiento de tumores. Es decir, el anticuerpo anti-hDlk-1 y

el complejo anticuerpo-agente de la presente invención son útiles como ingredientes activos contenidos en un agente terapéutico tumoral, un inhibidor de la angiogénesis tumoral y un agente de diagnóstico de tumores.

Es preferible proporcionar la composición farmacéutica en forma de una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-hDlk-1 y / o el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención como ingrediente(s) activo(s) y que comprende además un vehículo farmacológicamente aceptable.

Las enfermedades diana (tumores), a las que se aplica la composición farmacéutica, incluyen: los tumores humanos conocidos mencionados anteriormente en los que la expresión de hDlk-1 se había confirmado (específicamente, cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis tipo 1, cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y cáncer de ovarios, y cánceres de la sangre tales como el síndrome mielodisplásico y la leucemia mielocítica aguda); y cuya expresión de hDlk-1 se ha conformado anteriormente, y el cáncer de colon humano y el cáncer de mama humano en los que la expresión de hDlk-1 la han confirmado recientemente los presentes inventores por primera vez. Entre otros, uno o dos o más tipos seleccionados de cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico humano y neurocitoma humano son particularmente preferibles. Dicha enfermedad diana puede ser una sola enfermedad, o dos o más enfermedades pueden desarrollarse en combinación.

Ejemplos del "vehículo farmacológicamente aceptable" incluyen un excipiente, un diluyente, un expansor, un disgregante, un estabilizante, un conservante, un tampón, un emulsionante, un aromático, un agente colorante, un edulcorante, un espesante, un corrector, un solubilizante y otros aditivos. Usando de uno o más tipos de tales vehículos, se puede preparar una composición farmacéutica en forma de una inyección, un agente líquido, una cápsula, una suspensión, una emulsión, un jarabe, etc. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral o parenteral. Otra forma para la administración parenteral es una inyección que comprende uno o más ingredientes activos, que se prepara por un método ordinario. Tal inyección se puede producir disolviendo o suspendiendo el presente anticuerpo en un vehículo farmacológicamente aceptable, tal como una solución salina normal o agua destilada disponible comercialmente usada para inyectables.

En particular, cuando un fragmento de anticuerpo derivado del anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención (en particular, un fragmento de anticuerpo con un peso molecular bajo) se administra en un cuerpo vivo, se puede utilizar un sistema de dispersión coloidal además de los componentes mencionados anteriormente. Se prevé que dicho sistema de dispersión coloidal tenga un efecto de potenciación de la estabilidad de un compuesto (un fragmento de anticuerpo) en un cuerpo vivo o un efecto de transportar de manera eficiente un compuesto de este tipo a un órgano, tejido o célula específico. El tipo de dicho sistema de dispersión coloidal no está limitado, siempre que utilice de forma habitual. Un ejemplo de un sistema de dispersión coloidal de este tipo es un sistema de dispersión que comprende, como una base, polietilenglicol, un complejo macromolecular, un agregado macromolecular, una nanocápsula, microesferas, perlas y lípidos que incluyen un aceite con un emulsionante de agua, micelas, micelas mixtas y liposomas. Ejemplos preferidos de un sistema de dispersión coloidal de este tipo incluyen múltiples liposomas y las vesículas de membrana artificial, que tienen un efecto de transportar de manera eficiente un compuesto de este tipo a un órgano, tejido, o célula específicos (Mannino et al., *Biotechniques*, 1988, 6, 682; Blume y Cevc, *Biochem. et Biophys. Acta*, 1990, 1029, 91; Lappalainen et al., *Antiviral Res.*, 1994, 23, 119; Chonn y Cullis, *Current Op. Biotech.*, 1995, 6, 698).

La dosis de la composición farmacéutica varía dependiendo de la edad, el sexo, el peso corporal y los síntomas de un paciente, los efectos terapéuticos, un método de administración, un tiempo de tratamiento, los tipos del anticuerpo anti-hDlk-1 y del complejo anticuerpo-agente de la presente invención contenida en la composición farmacéutica, etc. En general, la composición farmacéutica puede administrarse en el intervalo entre 600 µg y 6000 mg por adulto por administración. Sin embargo, la dosis no está limitada al intervalo mencionado anteriormente.

En un caso donde se administra la composición farmacéutica en forma de una inyección, por ejemplo, se puede administrar en una dosis de 100 µg a 100 mg, por administración, por peso corporal de un paciente humano, una vez o dividida en varias administraciones, como una dosis diaria media. Ejemplos de la forma de dosificación incluyen, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intradérmica, inyección intramuscular e inyección intraperitoneal. De estos, la inyección intravenosa es preferible. Además, dicha inyección puede prepararse en la forma de un diluyente no acuoso (por ejemplo, polietilenglicol, aceite vegetal tal como aceite de oliva, alcoholes tales como etanol, etc.), una suspensión, o una emulsión. Tal inyección se puede esterilizar por esterilización utilizando un filtro mecánico, la mezcla de un microbicida, etc. La inyección se puede producir en forma de una inyección a preparar antes de usar. Es decir, una composición sólida esterilizada se prepara mediante un método de liofilización o similar, y la composición se disuelve en agua destilada esterilizada usada para la inyección u otros disolventes antes de su uso, de modo que se pueda utilizar a continuación.

El anticuerpo anti-hDlk-1 y / o el complejo anticuerpo-agente de la presente invención se puede utilizar en la producción de un producto farmacéutico (un agente) para el tratamiento y / o diagnóstico de un tumor. Además, la presente invención proporciona el anticuerpo anti-hDlk-1 antes mencionado y / o el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención, que se utilizan para el tratamiento y / o diagnóstico de tumores.

Además, la presente invención proporciona un método in vitro para diagnosticar o detectar un tumor, que comprende la utilización del anticuerpo anti-hDlk-1 mencionado anteriormente y / o el complejo de anticuerpo-agente de la presente invención. Además, la presente invención también proporciona el uso del anticuerpo anti-hDlk-1 mencionado anteriormente y / o complejo de anticuerpo-agente de la presente invención en el tratamiento y / o en el diagnóstico in vivo de un tumor.

5. Método para diagnosticar o detectar tumores

El método para diagnosticar o detectar un tumor de la presente invención se caracteriza porque comprende permitir que el anticuerpo anti-hDlk-1 mencionado anteriormente de la presente invención reaccione con una muestra obtenida de un cuerpo vivo (en lo sucesivo denominado muestra biológica) y detectar una señal del anticuerpo reaccionado.

Como se ha descrito anteriormente, puesto que se ha confirmado que hDlk-1 se expresa específicamente en diversos tipos de células tumorales, hDlk-1 y, en particular, hDlk-1 libre (una porción de la región extracelular de hDlk-1) se puede utilizar como un marcador para diversos tipos de tumores. En particular, tales hDlk-1 se pueden usar preferentemente como marcador para el cáncer de colon humano, cáncer de mama humano y cáncer de hígado humano.

Por lo tanto, se permite que el anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención reaccione con una muestra biológica y una señal del anticuerpo reaccionado se detecta a continuación, a fin de detectar el tumor. La señal de anticuerpo obtenido puede usarse como indicador de la cantidad de antígeno en la muestra biológica (es decir, una cantidad de hDlk-1 o de hDlk-1 libre). En la detección del tumor utilizando el anticuerpo de la presente invención, en primer lugar, se permite que una muestra biológica recogida como muestra de un sujeto, tal como una sección de tejido o sangre usada como diana de ensayo se una al anticuerpo de la presente invención mediante una reacción antígeno-anticuerpo. Posteriormente, sobre la base de los resultados de la medición de la cantidad de anticuerpo unido, se mide la cantidad de antígeno de interés contenido en la muestra biológica. Esta medición puede llevarse a cabo de conformidad con métodos de inmunoensayo conocidos. Por ejemplo, se puede usar un método de inmunoprecipitación, un método de inmunoaglutinación, inmunoensayo marcado, inmunonefelometría, un método de transferencia de tipo Western, citometría de flujo y similares. En un inmunoensayo marcado, se usa un anticuerpo marcado y por lo tanto una señal de anticuerpo se expresa como la cantidad de anticuerpo marcado que se detecta directamente. Por el contrario, un anticuerpo cuya concentración o título de anticuerpos se ha conocido puede usarse como solución estándar y, por lo tanto, una señal del anticuerpo diana se puede expresar como un valor relativo. Es decir, se pueden medir tanto la solución patrón como el analito usando un dispositivo de medición y una señal de anticuerpos en una muestra biológica se puede expresar como un valor relativo al valor de la solución estándar que se utiliza como criterio. Ejemplos de tales inmunoensayo etiquetadas incluyen el método ELISA, el método de IE, el método RIA, inmunoensayo de fluorescencia (FIA) e inmunoensayo de luminiscencia. De estos, el método de ELISA es particularmente preferible en cuanto a que es simple y altamente sensible.

En la presente invención, el estado de tumor puede evaluarse o diagnosticarse, usando el resultado de detección obtenido por el método de detección antes mencionado como indicador. Por ejemplo, cuando el resultado de la detección supera un valor estándar predeterminado, el estado de tumor se define como tumor positivo y cuando el resultado de la detección es menor que el valor estándar predeterminado, se define como tumor negativo. En el caso de tumor positivo, se determina que un cierto tipo de tumor podría haberse desarrollado y, por lo tanto, el estado del tumor se puede evaluar. El término "estado de tumor" se usa en el presente documento para significar la presencia o ausencia del desarrollo de tumor, o el grado de progresión del mismo. Por lo tanto, ejemplos específicos del estado de tumor incluyen la presencia o ausencia del desarrollo de tumor, el grado de progresión del mismo, el grado de malignidad, la presencia o ausencia de metástasis y la presencia o ausencia de recurrencia.

En la evaluación antes mencionada, como estado de tumor a evaluar, sólo se puede seleccionar un estado a partir de los ejemplos mencionados anteriormente, o múltiples ejemplos pueden combinarse y seleccionarse. La presencia o ausencia de tumor se pueden evaluar mediante la determinación de si el tumor se ha desarrollado o no, con referencia al valor estándar predeterminado usado como límite, basándose en el resultado de detección obtenido. El grado de malignidad se utiliza como indicador que indica el grado de progresión del cáncer. Basándose en el resultado de la detección, el tumor diana se puede clasificar en un cierto estadio de la enfermedad y puede evaluarse. Por otro lado, el cáncer temprano y cáncer avanzado se pueden distinguir entre sí y, a continuación se pueden evaluar. Por ejemplo, también es posible determinar el tumor diana como cáncer temprano o cáncer avanzado, utilizando el resultado de la detección como indicador. La metástasis tumoral se puede evaluar mediante la determinación de si la neoplasia ha aparecido o no en un sitio lejano a la posición de la lesión inicial, usando el resultado de la detección como indicador. La recurrencia se puede evaluar mediante la determinación de si el resultado de la detección ha superado o no el valor estándar predeterminado de nuevo después de la etapa de intervalo o de remisión.

6. Kit para diagnosticar o detectar tumores

El anticuerpo anti-hDlk-1 de la presente invención se puede proporcionar en forma de un kit para detectar o diagnosticar un tumor. El kit de la presente invención comprende una sustancia marcadora, un reactivo de fase sólida sobre el que se ha inmovilizado el anticuerpo o el anticuerpo marcado, etc., así como el anticuerpo antes mencionado. El anticuerpo marcado significa un anticuerpo marcado con una enzima, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto quimioluminiscente, etc. El kit de la presente invención también puede comprender otros reactivos utilizados para llevar a cabo la detección de la presente invención, además de los elementos constitucionales antes mencionados. Por ejemplo, cuando una sustancia de marcaje de este tipo es una sustancia marcadora enzimática, el kit de la presente invención puede comprender un sustrato enzimático (un sustrato cromogénico, etc.), una solución de disolución del sustrato enzimático, una solución de detención de la reacción enzimática, un diluyente utilizado para analitos, etc. Además, el presente kit puede comprender adicionalmente diversos tipos de tampones, agua esterilizada, diversos tipos de recipientes de cultivo celular, diversos tipos de reactores (un tubo Eppendorf, etc.), un agente de bloqueo (un componente de suero tal como seroalbúmina bovina (BSA), leche descremada, o suero de cabra), un agente de lavado, un agente tensioactivo, varios tipos de placas, un antiséptico tal como azida sódica, un manual de operación experimental (instrucción), etc.

El kit de la presente invención puede usarse eficazmente para llevar a cabo el método de detección antes mencionado de la presente invención y por lo tanto es extremadamente útil.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente en los ejemplos siguientes.

[Ejemplo 1]

La divulgación relativa a los anticuerpos distintos de DI-2-14 se incluye para referencia y / o sólo con fines comparativos.

<Materiales y métodos>

1. Líneas celulares

Las líneas celulares HEK-293-hDlk-1, 7E2-C-hDlk-1 y Huh-7-hDlk-1 se produjeron de acuerdo con las descripciones del documento WO 2005/052156 y se usaron. Por otra parte, las células de neuroblastoma humano SK-N-F1 se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC; N° de catálogo CRL2142).

Las células SW480-hDlk-1 se obtuvieron mediante la introducción de un vector de expresión, pcDNA- hdlk-Flag (consulte el documento WO 2005/052156) que contenía una gen de hDlk-1 de longitud completa, en una línea celular derivada de cáncer de colon humano, SW480 (obtenido del Laboratory of Cell Growth and Differentiation, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, University of Tokyo), a continuación, seleccionando células utilizando un antibiótico G418 (geneticina, Gibco BRL) y estableciendo después una línea celular que expresara de forma estable hDlk-1.

2. Preparación del anticuerpo policlonal anti-hDlk-1

Con el fin de construir un vector de expresión de la región extracelular de hDlk-1 (FA-1) se sintetizaron y diseñaron los siguientes cebadores.

Cebador directo (F): 5'-cgcgctccgaaccagaagccc-3' (SEC ID N° 3)

Cebador inverso (R): 5'-ctcgaggtgctccggctgctgcacggc-3' (SEC ID N° 4)

Para diseñar el cebador R, se añadió al cebador R la secuencia de la enzima de restricción digerida por XhoI. La reacción de PCR se llevó a cabo con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción utilizando estos cebadores y ADNc de hDlk-1 como molde.

«Composición de la solución de reacción»

ADNc molde:	1 µl
10 x tampón de PCR:	5 µl
dNTP 2,5 mM	4 µl
ADN polimerasa Taq	0,5 µl
Cebador F (10 µM)	1 µl
Cebador R (10 µM)	1 µl
Agua esterilizada	37,5 µl
Total	50 µl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 95 °C (60 s) → Hibridación: 55 °C (60 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

El ADNc obtenido de la región extracelular de hDlk-1 (FA1 humano) se clonó en un vector pCRII (Invitrogen) (pCRII-hFA1). El ADNc de FA1 humano clonado se confirmó con un secuenciador.

Un fragmento de EcoRI / XhoI que contiene el ADNc de FA1 humano se cortó de pCRII-hFA1 y luego se insertó en el sitio EcoRI / XhoI de un vector pcDNA4 / Myc-His (Invitrogen) (pcDNA4-hFA1). Se añadió un marcador Myc e His al C-terminal de la proteína Dlk-1 de este vector de expresión y, por lo tanto, el FA1 humano se expresó como proteína de fusión con el marcador Myc y el marcador His. La proteína de fusión se usó como un antígeno y se inmunizó a un conejo con el antígeno de acuerdo con un método ordinario, a fin de preparar un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1.

3. Preparación de mutantes de delección del motivo de tipo EGF del gel de hDlk-1

Para el uso en el análisis de epítipo del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 se prepararon mutantes de delección del motivo de tipo EGF del gen de hDlk-1, como se describe a continuación.

En primer lugar, se prepararon los cebadores utilizados para amplificar la región diana por un método de PCR. Las secuencias de los cebadores preparados son como se muestra en la siguiente Tabla 1. Para preparar los cebadores, se añadió al cebador F una secuencia de enzima de restricción digerida con NotI y una secuencia de la enzima de restricción digerida con XbaI al cebador R. Sin embargo, dicha secuencia de la enzima de restricción digerida con XbaI no se añadió al cebador R usado para amplificar las regiones de EGF (4-6) y EGF (5-6). Cabe destacar que, en la columna "construcción" en la Tabla 1, la notación tal como "EGF (1-4)" significa regiones contiguas de EGF-1 a EGF-4 en los 6 motivos de tipo EGF (EGF 1 a EGF-6) existentes en la región FA-1 de hDlk-1.

Tabla 1

Construcción	Nombre del cebador*	Secuencia del cebador	SEC ID N°
EGF(1-4)	Y403Not	5'- gcggccggctgaatgcttcccggcc -3'	5
	Y402Xba	5'- tctagagaggctgttgccacgatctcgc -3'	6
EGF(1-3)	Y403Not	5'- gcggccggctgaatgcttcccggcc -3'	7
	Y410Xba	5'- tctagacccgtccttttctggcagtc -3'	8
EGF(1-2)	Y403Not	5'- gcggccggctgaatgcttcccggcc -3'	9
	Y405Xba	5'- tctagagggcccgaacatctctatcac -3'	10
EGF(4-6)	Y409Not	5'- gcggccgcaaaaaggacgggcccctgtg -3'	11
	Rv	5'- gcgtatagtaagctctgcgg -3'	12
EGF(5-6)	Y401Not	5'- caggcagcgccgcgagatcgtggccaac -3'	13
	Rv	5'- gcgtatagtaagctctgcgg -3'	14

*Con respecto a cada construcción, el recuadro superior indica el cebador F y el inferior indica el cebador R.

Usando cada uno de los cebadores anteriormente mencionados, se llevó a cabo la PCR con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción.

«Composición de la solución de reacción»

ADNc molde:	1 µl
10 x tampón de PCR:	5 µl
dNTP 2,5 mM	4 µl
ADN polimerasa Taq	0,5 µl
Cebador F (10 µM)	1 µl
Cebador R (10 µM)	1 µl
Agua esterilizada	37,5 µl
Total:	50 µl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 95 °C (60 s) → Hibridación: 55 °C (60 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

Cada fragmento amplificado por el método de PCR se clonó en un vector pCRII (Invitrogen) utilizando un kit de clonación TA (Invitrogen) y la secuencia de nucleótidos de los mismos a se confirmó después. A continuación se obtuvo un fragmento por escisión con NotI / XbaI y después este fragmento se subclonó en el sitio NotI / XbaI de pME18S-CFHX-FXYD TM. Cabe destacar que pME18S-CFHX-FXYD TM es un vector de expresión, que se ha diseñado de tal manera que la proteína de interés expresada podría tener la secuencia de señal de CD8a humana (nº de acceso en GenBank NM_001768) y una secuencia del marcador de His en el N-terminal de la misma (obtenida del Laboratory of Cell Growth and Differentiation, Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo).

4. Preparación del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

(1) Inmunización celular, inmunización con antígeno proteico

Las líneas celulares que expresan hDlk-1 (células HEK-293 y células 7E2-C-hDlk = 1) y la región FA-1 de hDlk-1 (denominado en lo sucesivo HFA-1) preparados mediante el método mencionado se usaron como antígeno. En el caso de las líneas celulares que expresan hDlk-1, 1×10^7 células se mezclaron con un adyuvante de inmunización (adyuvante completo de Freund; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) o TiterMax Gold (Funakoshi Corp.) en una proporción de mezcla de 1: 1. En el caso de la proteína hFA-1, se mezclaron 20 µg de la proteína con un adyuvante de inmunización (adyuvante completo de Freund; Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) o TiterMax Gold (Funakoshi Corp.) en una proporción de mezcla de 1: 1. Por lo tanto, se preparó una emulsión mediante dicha mezcla y después se inyectó en ambas almohadillas de las patas de ratas de 6 semanas de edad (Wistar) y ratones (C57 / BL6, Balb / c) (inmunización inicial). Tres días y diez días después de la inmunización inicial, se realizó un refuerzo. el día después de la inmunización final, se obtuvieron los ganglios linfáticos de ambas rótulas de ellos y a partir de ellos se prepararon linfocitos. Para el refuerzo, una suspensión de células formada por la suspensión de 5×10^6 células en PBS se utilizó en el caso de la inmunización con células. En el caso de un antígeno de proteína, se utilizaron 5 µg en una solución de PBS. El día después de la inmunización final, se obtuvieron los ganglios linfáticos de ambas rótulas de ellos y a partir de ellos se prepararon linfocitos. Para el refuerzo, se utilizó una suspensión de células usando PBS como antígeno. Los linfocitos preparados de este modo se mezclaron con una línea celular de mieloma de ratón (P3-X63-Ag8.653) a una relación de mezcla de 3: 1 y la fusión celular se llevó después a cabo mediante un método con polietilenglicol. Se utilizó un medio que contiene HAT selectivo (aminopterina, hipoxantina y timidina) y las células se cultivaron en una placa de 96 pocillos de fondo plano, una incubadora de CO₂ al 5 %. Las células se cultivaron durante 10 a 14 días y un sobrenadante de cultivo de los hibridomas proliferantes se sometió a un primer cribado de acuerdo con Cell ELISA (como se describe más adelante) y después se sometió a un segundo cribado según el análisis FACS usando células HEK-293-hDlk. A continuación, los clones de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 se prepararon por un método de dilución límite.

(2) Inmunización con ADN

Asimismo, para el propósito de preparar anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 utilizando un método denominado método de inmunización con ADN, se produjeron los anticuerpos monoclonales que reconocen la estructura tridimensional de hDlk-1 e inhiben sus actividades biológicas. En el caso del método de inmunización con ADN, ya que un gen de hDlk-1 incorporado en el vector de expresión introducido se expresa en el cuerpo de un ratón, se hace posible presentar un antígeno, mientras se mantiene la estructura tridimensional original o varios tipos de modificaciones postraduccionales (por ejemplo, modificación de la cadena de azúcar, reticulación con disulfuro, etc.). Por lo tanto, se realizó un intento de producir anticuerpos monoclonales específicos que reconozcan la estructura tridimensional original de hDlk-1 e inhiban sus actividades biológicas del organismo, aunque la producción de un anticuerpo monoclonal de este tipo específico sería difícil cuando la proteína desnaturalizada convencional o el péptido sintético se utilizó como inmunógeno.

El ADNc de longitud completa de hDlk-1 se incorpora en un vector de expresión de mamífero marcado. Si la construcción génica producida se expresaba o no en una superficie celular, como había sido diseñado, se examinó antes de la inmunización, utilizando células de mamífero. Es decir, la construcción génica producida se introdujo transitoriamente en las células de mamífero. La construcción génica introducida en las células de mamífero se cultivó en una incubadora de CO₂ durante 24 horas y se usó a continuación en el análisis FCM. Para tal análisis FCM, un anticuerpo que reacciona con el marcador añadido al gen introducido anteriormente mencionado a la solución de cultivo que contiene las células cultivadas con el gen introducido y luego la solución se dejó en reposo durante 30 minutos. A continuación se añadió un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia que reconoce específicamente el marcador a la solución de reacción y después la solución se dejó en reposo durante 30 minutos. Después, la solución de reacción se utilizó en el análisis FCM. Se demostró que la construcción génica producida en la presente invención se expresó en la superficie celular.

A fin de desarrollar un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 que reconoce la estructura tridimensional de hDlk-1 e inhibe sus actividades biológicas, diversos tipos de construcciones génicas como se ha construido anteriormente se usaron solos o en combinación y se introdujeron en un animal a inmunizar de acuerdo con diversos métodos de introducción de genes (inyección intramuscular, la electroporación, o una pistola génica) (durante aproximadamente 2 a 3 meses). Para analizar suero recogido del animal inmunizado, se utilizaron las células HEK293-hDlk-1 mencionadas anteriormente. El suero recogido del animal inmunizado con el gen introducido antes mencionado se añadió a un medio de cultivo que contiene las células HEK293-hDlk-1 y luego el medio de cultivo se dejó en reposo durante 30 minutos. A continuación, se añadió un anticuerpo secundario marcado con fluorescencia, que reconoce específicamente la inmunoglobulina del animal inmunizado a la solución de reacción. Después de que la solución se dejara en reposo durante 30 minutos, se usó en el análisis de la FCM. Un animal que produce un anticuerpo específico que reconoce fuertemente las células HEK293-hDlk-1 se diseccionó y las células B se aislaron a partir del animal de acuerdo con un método ordinario, a fin de producir un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1.

5. Purificación del anticuerpo

Los clones de hibridoma producidos por el método antes mencionado se administraron a una densidad celular de 3×10^6 células en la cavidad abdominal de un ratón BALB / c atímico al que se había administrado previamente (7 días antes) 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano). Dos semanas más tarde se recogió la ascitis. A continuación se realizó la purificación por afinidad de la ascitis usando una columna de proteína G (proteína HiTrap G; GE Healthcare Biosciences) después de la precipitación con ácido caprílico, con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 producido por cada clon de hibridoma. Los análisis posteriores se llevaron a cabo utilizando los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 purificados de este modo.

6. Marcaje del anticuerpo

Con el fin de clasificar los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 producidos de este modo sobre la base de los epítomos o con el fin de evaluar la actividad de internalización, se marcaron los anticuerpos obtenidos. El marcaje con biotina del anticuerpo se llevó a cabo utilizando el módulo biotinilación de proteínas ECL (GE Healthcare Biosciences; RPN2202). El marcaje con rodamina del anticuerpo se llevó a cabo utilizando el kit EZ-Label™ Rhodamine Protein Labeling (Pierce; 53002). El marcaje con FITC del anticuerpo se llevó a cabo utilizando el kit EZ-Label™ Fluorescein Isothiocyanate (FITC) Protein Labeling kit (Pierce; 53004). Se utilizó el manual incluido en cada kit.

7. ELISA celular

La línea celular 7E2-C-hDlk-1 mencionada anteriormente se sembró a una densidad celular de $7,5 \times 10^3$ células / pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos recubiertos con gelatina (Corning) y las células se cultivaron a continuación a 37 °C durante 2 días. Después de lavar las células con PBS enfriado con hielo, se fijaron con una solución de paraformaldehído al 4 % y después se trataron con una solución al 0,2 % de Triton-X-100 (nombre del producto) a fin de obtener una placa utilizada para ELISA de células. A continuación, se llevó a cabo un método de ELISA de acuerdo con un método ordinario. Los procedimientos específicos son como sigue.

En primer lugar, se llevó a cabo el bloqueo utilizando una solución de BSA-PBS al 1 % a temperatura ambiente durante 2 horas. Posteriormente, se añadió un sobrenadante de hibridoma y la mezcla se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente, las células (o placas) se lavaron con una solución de PBS-Tween 20 al 0,1 % (nombre del producto) 3 veces. La IgG anti-rata biotinilada (Vector Laboratory) se diluyó 100 veces con una solución al 0,1 % de Tween 20-PBS y se utilizó como anticuerpo secundario. Las células se dejaron reaccionar con él a temperatura ambiente durante 1 hora y después las células se lavaron con una solución 0,1 % de Tween 20-PBS 3 veces. A continuación, la peroxidasa de rábano-estreptavidina (HRP; Laboratorio Vector) diluida 1.000 veces con una solución de Tween 200,1 %-PBS se dejó reaccionar con las células a temperatura ambiente durante 1 hora y después las células se lavaron con una solución de Tween 20 al 0,1 %-PBS 3 veces. Se añadió una solución de sustrato de TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina; SIGMA) a las células para llevar a cabo una reacción cromogénica y después se añadió ácido sulfúrico 1 M y a la solución de reacción para terminar la reacción. Usando un lector de microplacas Modelo 550 (Bio-Rad) se midió la absorbancia.

8. Análisis FACS

Las células se retiraron de la placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y se preparó una suspensión de células (densidad celular: 5×10^6 células / ml). Después 0,5 µg de un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 se dejó reaccionar con 100 µl de la suspensión de células a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar el producto de reacción con PBS, se dejó reaccionar con IgG anti-ratón marcada con PE o IgG anti-rata marcada con PE (ambos disponibles en BD Pharmingen) (0,5 µg) a 4 °C durante 30 minutos, seguido de análisis usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

9. Cálculo de la constante de disociación (valor Kd) por el método ELISA

La afinidad de antígeno (valor Kd) de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 producidos se calcularon mediante un método ELISA (Djavadi-Ohanian L. et al. (1996), en Antibody Engineering, Capítulo 4, pp. 77-97. IRL Press, Oxford).

Específicamente, se añadió la proteína hFA-1 recombinante purificada (1 µg / ml) a una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning) para fijar como un antígeno (a temperatura ambiente durante 1 hora). Posteriormente, la placa se lavó con PBS 3 veces y se añadió leche descremada al 2 % (solución de PBS) para el bloqueo (a temperatura ambiente durante 1 hora). Después de lavar la placa con PBS 2 veces, se formó un complejo antígeno-anticuerpo formado mediante mezclado previo con una solución de antígeno (una proteína purificada HFA-1; 50, 25, 12,5, 6,25 y 3,125 nM) con cada clon del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (0,5 nM) y después de equilibrar la mezcla se añadió a la placa de ELISA mencionada anteriormente para una reacción (a temperatura ambiente durante 1 hora). Después de lavar la placa con PBS 3 veces, se dejó reaccionar con IgG anti-ratón marcada con HRP (concentración final: 1 µg/ml) o IgG anti-rata marcada con HRP (concentración final: 1 µg / ml) (ambos disponibles en GE Healthcare Biosciences), que se había diluido con una solución de bloqueo, a temperatura ambiente durante 1 hora.

10. Análisis del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

Los aproximadamente 100 tipos anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 preparados se clasificaron por epítopos que los reconocen. Cada uno de los vectores de expresión antes mencionados, / hdlk-EGF(1-3)/pME18S-CFHX, hdlk-EGF (3-4)/pME18S-CFHX y hdlk-EGF (4-6)/pME18S-CFHX se introdujo en las células COS-7. De 24 a 72 horas después de la introducción del gen, las células se retiraron de una placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y el tipo de un motivo de tipo EGF de hDlk-1 reconocido por cada clon de anticuerpo se examinó después mediante análisis FACS.

11. Método de inmunohistotinción

Una matriz de tejido de cáncer humano (Cybrdi; matriz de tejido de cáncer de colon, lote: CC05-01-001; matriz de tejido de cáncer de mama, lote: CC08-02-002) se sometió a un tratamiento de desparafinación. A continuación, se sometió a un tratamiento de activación del antígeno utilizando una autoclave (121 °C, 5 minutos) en un tampón de ácido cítrico 10 mM (pH 6,0) y después se utilizó en la tinción usando un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1. Una reacción cromogénica se llevó a cabo utilizando DAB (3,3'-diaminobenzidina) como sustrato y, posteriormente, se llevó a cabo la tinción nuclear usando hematoxilina como contratinción. Específicamente, se llevaron a cabo las siguientes operaciones.

Una sección, que se había fijado con formalina neutra y se había embebido en parafina, se sometió a un tratamiento de desparafinación y luego a un tratamiento de activación del antígeno utilizando una autoclave (121 °C, 5 minutos) en una solución de citrato de sodio 10 mM. Posteriormente, la sección resultante se trató a temperatura ambiente durante 20 minutos con una solución formada por la adición de una solución de peróxido de hidrógeno a metanol a una concentración final de 0,3 %, a fin de eliminar la actividad de peroxidasa endógena. A continuación, la sección se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos 2 veces y después se bloqueó durante 30 minutos usando un reactivo de Block-Ace (Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.), para llevar a cabo una operación de bloqueo de los sitios de unión inespecífica en los tejidos. Posteriormente, un anticuerpo policlonal anti-hDlk-1 (concentración final: 0,5 µg/ml), que se había diluido con un reactivo de Block-Ace diluido 1/10, se dejó reaccionar con la sección a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavó con PBS durante 5 minutos 3 veces. Después, un anticuerpo IgG anti-conejo biotinilado, que se había diluido 100 veces con un reactivo de Block-Ace diluido 1/10, se dejó reaccionar con la sección a temperatura ambiente durante 1 hora y luego se lavó con PBS durante 5 minutos 3 veces. A continuación, los reactivos de un kit de ABC se mezclaron de acuerdo con las instrucciones incluidas con el mismo para producir un complejo de ABC y luego se dejó reaccionar con la sección a temperatura ambiente durante 30 minutos. El resultante se lavó con PBS durante 5 minutos 3 veces y luego una reacción cromogénica se llevó a cabo usando un sustrato de peroxidasa (0,02 % DAB (3,3'-diaminobenzidina), una solución de peróxido de hidrógeno 0,03 % y Tris-HCl 50 mM (pH 7,5)). Después de la confirmación de desarrollo de color, el producto de reacción se lavó con agua durante 10 minutos y luego el núcleo se tiñó con solución de hematoxilina de Mayer (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.). Posteriormente, se deshidrató con alcohol, se penetró con xileno y luego se embebió con Entellan new (Merck Japón).

12. Preparación de los ratones portadores de cáncer y evaluación de la eficacia del fármaco de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1

(1) Modelo de prevención

Una línea celular de cáncer de hígado (Huh-7-hDlk-1) que expresa hDlk-1 se retiró mediante tratamiento con tripsina y después se añadió PBS para preparar una suspensión celular a una densidad celular de 6×10^7 células / ml. La suspensión se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron por vía subcutánea 100 µl (3×10^6 células) de la mezcla en el flanco derecho de cada ratón atómico

hembra de 6 semanas de edad (Balb / c, nu / nu). El día del trasplante de las células cancerosas, los ratones se dividieron en varios grupos y se inició la administración de un anticuerpo (20 mg / kg de peso corporal, administración intraperitoneal). A continuación, se llevó a cabo la misma administración anterior a intervalos de una vez cada 3 días. La actividad antitumoral se evaluó sobre la base de la frecuencia de la formación de tumores y el volumen del tumor. Dicho volumen del tumor se calculó usando la siguiente expresión:

$$\text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{eje menor})^2 \times (\text{eje mayor}) \times (\pi/6)$$

(2) Modelo de tratamiento

Una línea celular de cáncer de hígado (Huh-7-hDlk-1) que expresa hDlk-1 y una línea celular de cáncer de colon (SW480-hDlk-1) que expresa hDlk-1 se retiraron mediante un tratamiento con tripsina y cada línea celular se añadió después a PBS para preparar una suspensión celular a una densidad celular de 6×10^7 a 10×10^7 células / ml. La suspensión se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l (3×10^6 a 5×10^6 células) de la mezcla en el flanco derecho de cada ratón atímico hembra de 6 semanas de edad (Balb / c, nu / nu). De diez a catorce días después del trasplante de las células cancerosas, los ratones cuyo volumen tumoral se había convertido en de 50 a 150 mm³ (valor medio: aproximadamente 100 mm³) se dividieron en varios grupos. El día en que se dividieron los ratones se definió como una primer día (Día 1) y se inició la administración de un anticuerpo dicho día. El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones a intervalos de una vez cada 3 días (20 mg / kg de peso corporal). La actividad antitumoral se evaluó midiendo el volumen del tumor. Se llevó a cabo una prueba de diferencia significativa mediante una prueba t de Student y cuando el valor obtenido fue de $P < 0,05$, se determinó que era estadísticamente significativa.

13. Evaluación de la actividad internalización del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

La actividad de internalización, mediante la cual un anticuerpo monoclonal hDlk-1 se incorpora en las células mediado por endocitosis después de que se ha unido a un antígeno, depende de un epítipo reconocido por el anticuerpo. Por lo tanto, se evaluó la actividad de internalización de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 producidos. Como método para evaluar la actividad de internalización por análisis de FACS, tal actividad internalización se evaluó mediante análisis FACS y la observación con un microscopio de fluorescencia.

La evaluación de la actividad internalización mediante análisis de FACS se llevó a cabo mediante el siguiente método. Un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (0,5 μ g) se añadió a células HEK-293-hDlk-1 (2×10^5 células) para la reacción (4 °C, 20 minutos) y las células se lavaron con PBS 2 veces. Posteriormente, las células se suspendieron en un medio DMEM, seguido de incubación a 37 °C (60 minutos, 90 minutos, 120 minutos y 240 minutos), a fin de fomentar la internalización de un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie celular. Posteriormente, las células se centrifugaron (1.000 rpm, 5 minutos) para recuperarlas y las células recuperadas se dejaron reaccionar (4 °C, 20 minutos) con IgG anti-ratón (o rata) marcada con PE (0,5 μ g). Posteriormente, las células se analizaron mediante FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Este mismo método, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 marcado con FITC se dejó reaccionar con células HEK-293-hDlk-1 por el mismo método anterior y las células se lavaron después con PBS 2 veces. Posteriormente, las células se suspendieron en medio DMEM, seguido de incubación a 37 °C (120 minutos). Las células se analizaron después mediante FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Adicionalmente se añadió un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 marcado con rodamina (0,5 μ g) se añadió a células HEK-293-hDlk-1 (2×10^5 células) para la reacción (4 °C, 20 minutos) y las células se lavaron con PBS 2 veces. Posteriormente, las células se suspendieron en medio DMEM, seguido de incubación a 37 °C (15 minutos, 30 minutos, 60 minutos y 120 minutos). A continuación se prepararon preparaciones de frotis mediante Cytospin (Shandon) (800 rpm, 3 minutos) y las preparaciones de frotis se atraparon después utilizando una solución de montaje (Laboratorio Vector). Después, la localización de un complejo antígeno-anticuerpo se observó con un microscopio de fluorescencia (Nikon; Eclipse E800).

14. Preparación del inmunoconjugado usando el anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

Saporina, una toxina proteica de origen vegetal, se conjugó con un clon de anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 M3-1 (IgG1 de ratón) que tiene una alta actividad de internalización tras la unión a un antígeno y con un clon M1-290 (IgG2b de ratón) utilizado como un control, a fin de preparar inmunoconjugados (Advanced Targeting System, San Diego).

15. Evaluación de la eficacia farmacológica de inmunoconjugados utilizando el anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

Las células se retiraron de una placa de cultivo mediante un tratamiento con tripsina y se preparó una suspensión de células a una densidad celular de 1×10^5 células en un medio DMEM, a la que se había añadido 10 % de FBS. La

suspensión celular se inoculó a una densidad celular de 1×10^4 células / pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo plano recubiertos con colágeno y las células se cultivaron a continuación durante 2 a 3 horas, de modo que las células se adherieron a ellos. Posteriormente, varios tipos de inmunocombinados tales como IgG de ratón-saporina (IgG-SAP), M3-1-saporina (M3-1-SAP) y M1-290-saporina (SAP-M1-290) se añadieron a las células. Cada inmunocombinado se añadió a esto en concentraciones de 0,1, 1, 10, 100 y 1000 ng / ml. De 48 a 72 horas después del cultivo se midió la absorbancia mediante un método de MTT.

Se evaluó la actividad antitumoral in vivo usando ratones portadores de cáncer en los que se utilizaron las células Huh-7-hDlk-1 antes mencionadas.

16. Método MTT

Se añadió TetraColor ONE (Seikagaku Corp.) a las células cultivadas en una placa de 96 pocillos y se hicieron reaccionar a continuación en un incubador de CO₂ al 5 % durante 3 a 4 horas. Después de la terminación de la reacción, la placa de 96 pocillos se aplicó directamente a un lector de microplacas, a fin de medir la absorbancia a una longitud de onda de 490 nm (longitud de onda de control: 655 nm).

<Resultados>

1. Análisis de la actividad inhibidora del crecimiento tumoral de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 conocidos (1C1, 4C4 y 31C4) en xenoinjertos de células de cáncer de hígado humano (modelos de prevención)

El hDlk-1 se expresa en las superficies de varios tipos de células cancerosas. Si un gen hDlk-1 se expresa de forma estable en una línea celular de cáncer de hígado humano se estimula significativamente una tasa de crecimiento del tumor cuando la línea celular se trasplanta subcutáneamente en un ratón atímico (por favor consulte el documento WO 2005/052156). Por lo tanto, un anticuerpo anti-hDlk-1 se considera útil como un agente terapéutico del cáncer. Dado que se conocen la secuencia génica/ secuencia de aminoácidos del propio hDlk-1, en principio, es posible obtener un anticuerpo monoclonal contra hDlk-1 de acuerdo con un método conocido utilizando un péptido sintético o una proteína purificada como inmunógeno. Sin embargo, en general, la posibilidad de producir realmente un anticuerpo que exhibe una actividad como agente terapéutico del cáncer, es decir, un anticuerpo que presenta una actividad antitumoral a nivel individual (in vivo) es aún desconocida y no puede estimarse a partir del tipo de antígeno, un nivel de expresión, una estructura de proteínas, etc. Entre aproximadamente varias decenas de miles de tipos de anticuerpos monoclonales, los que se han colocado en el mercado como agentes terapéuticos para enfermedades, incluyendo los tumores (cánceres) como ejemplos típicos son sólo aproximadamente 20 tipos. Como se desprende de este hecho, la mayoría de los anticuerpo presenta efectos farmacéuticos a nivel individual.

Se ha sabido que los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 conocidos (clones 1C1, 4C4 y 31C4) matan a las células de cáncer de hígado humano en presencia de, al menos, un complemento (véase el documento WO 2005/052156). Sin embargo, los efectos farmacéuticos de tales anticuerpos in vivo se desconocen.

En primer lugar, la actividad antitumoral in vivo de cada uno de los tres clones conocidos se examinó mediante el trasplante de una línea celular de cáncer de hígado (Huh-7-hDlk-1) que expresa hDlk-1 por vía subcutánea en un ratón atímico, iniciando la administración del anticuerpo al mismo tiempo de la trasplante y analizando después el efecto del anticuerpo sobre la implantación de las células tumorales por vía subcutánea en el ratón atímico y el crecimiento del tumor.

Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, en un caso donde se inició la administración del anticuerpo al mismo tiempo que el trasplante de células, a los 14 días (día 14) se formó tumor en los 10 individuos en un grupo control (IgG de rata administrada) (volumen tumoral medio: $382,0 \pm 74,8$ mm³). Por otro lado, en el caso de los grupos de administración de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1, la tasa de formación de tumores fue del 40 % en el grupo de administración de 1C1 y del 30 % en el grupo de administración de 4C4 y el grupo de administración de 31C4. Por lo tanto, la tasa de formación de tumores fue significativamente baja en los grupos de administración del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1. Incluso a los 21 días (día 21), la tasa de formación de tumores fue del 70 % en el grupo de administración de 1C1 y del 50 % en el grupo de administración de 4C4 y en el grupo de administración de 31C4. Por tanto, en todos los grupos de administración de anticuerpos, la formación del tumor se inhibió mediante la administración del anticuerpo. El volumen (valor medio) del tumor formado en los grupos de administración de anticuerpos fue menor que en el grupo control. Sin embargo, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los dos tipos de grupos.

Tabla 2

	Grupo de administración	N (Número de ratones)	Tasa de formación de tumores	Volumen tumoral (mm ³)
Día 14	IgG de rata	10	100 % (10/10)	382,0±74,8
	1C1	4	40 % (4/10)	656,2±241,21
	4C4	3	30 % (3/10)	77,1±30,0
	31 C4	3	40 % (3/10)	156,5±55,8

	Grupo de administración	N (Número de ratones)	Tasa de formación de tumores	Volumen tumoral (mm ³)
Día 18	IgG de rata	10	100 % (10/10)	979,2±152,7
	1C1	6	60 % (6/10)	646,7±280,8
	4C4	5	50 % (5/10)	371,7±118,2
	31C4	5	50 % (5/10)	474,5±163,1
Día 21	IgG de rata	10	100 % (10/10)	1464,4±207,6
	1C1	7	70 % (7/10)	899,25±308,4
	4C4	5	50 % (5/10)	653,5±212,8
	31 C4	5	50 % (5/10)	770,1±216,1,8

2. Análisis de la actividad inhibidora del crecimiento tumoral de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 conocidos (1C1, 4C4 y 31C4) en xenoinjertos de células de cáncer de hígado humano (modelos de tratamiento)

- 5 A fin de que un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 pueda exhibir su efecto farmacéutico como un anticuerpo terapéutico del cáncer, es extremadamente importante que el anticuerpo exhiba su actividad antitumoral en los tejidos tumorales establecidos. Además, en los modelos de prevención antes mencionados, la actividad antitumoral de un anticuerpo se puede presumir hasta cierto punto haciendo una comparación entre las tasas de formación de tumores. Sin embargo, estas tasas de formación de tumores varían ampliamente entre los individuos y, por tanto, la actividad antitumoral no se puede evaluar con precisión.

Así, las células Huh-7-hDlk-1 se trasplantaron por vía subcutánea en un ratón atímico y el efecto farmacéutico de cada anticuerpo se evaluó utilizando los modelos de tratamiento, en los que se inició la administración del anticuerpo en una etapa donde el volumen medio del tumor se había convertido en 100 mm³.

Como se muestra en la Figura 1, en el caso de tales modelos de tratamiento, cada uno de 1C1 (IgG1 de rata) (Figura 1A), 4C4 (IgG2a de rata) (Figura 1B) y 31C4 (IgG2a de rata) (Figura 1C) se administró a una dosis de 20 mg /kg de peso corporal en la cavidad abdominal del ratón atímico y se analizó el efecto del anticuerpo sobre el crecimiento tumoral. Sin embargo, como resultado de ello, ningún clon mostró una actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa.

3. Análisis de la actividad antitumoral de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 in vivo en xenoinjertos de células de cáncer de hígado humano (modelos de tratamiento)

- Es esencial para un anticuerpo terapéutico del cáncer dirigido a hDlk-1 que mata específicamente los tejidos tumorales que exprese hDlk-1 o para exhibir una actividad de inhibición del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto de tratamiento.

Los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 (aproximadamente 100 clones), producidos recientemente en la invención de la presente solicitud, se evaluaron también usando modelos de xenoinjerto tratamiento donde se usaron células Huh-7-hDlk-1. Entre los aproximadamente 100 clones recién producidos, la mayoría de los clones no exhibió su efecto farmacéutico en los modelos de tratamiento, como con los tres clones conocidos. Sin embargo se obtuvieron varios clones que exhiben actividad inhibidora del crecimiento tumoral significativa, tales como los clones DI-2-14, 2-13, BA-1-3D, DI-6 y M3-1.

En el clon del grupo de administración de DI-2-14 (IgG1 de ratón), después de la administración del anticuerpo, el crecimiento tumoral se inhibió en todos los individuos (N = 8). Al día decimocuarto (día 14) después del inicio de la administración del anticuerpo, el volumen del tumor fue de 175,5 ± 46,5 mm³ (P <0,01 por la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14, mientras que fue de 907,7 ± 142,8 mm³ en el grupo control (N = 8) (Figura 2A). Cuando se ha definido el volumen del tumor en el momento del inicio de la administración del anticuerpo se definió como de 1,0, el volumen del tumor al decimocuarto día (día 14) fue de 1,85 en el grupo de administración del clon DI-2-14, mientras que fue 9,24 en el grupo de control. El peso del tumor extirpado fue de 0,15 ± 0,04 (g) (P <0,01 por la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14, mientras que fue de 0,58 ± 0,07 (g) en el grupo control (Figura 2B).

Como se muestra en la Figura 2C, la actividad antitumoral del clon DI-2-14 administrado se reprodujo en otra prueba independiente. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, en una etapa donde el valor medio del volumen del tumor había alcanzado 100 mm³ (grupo de control: 103,8 ± 11 mm³ (N = 7); grupo de administración de DI-2-14: 101,4 ± 9,5 mm³ (N = 8)), se inició la administración del anticuerpo. Al decimocuarto día (día 14) después del inicio de la administración, el volumen de los tumores del grupo de administración del clon DI-2-14 fue 148,83 ± 32,65 mm³ (P <0,01 mediante la prueba t de Student), mientras que fue de 733,37 ± 244,86 mm³ en el grupo de control.

En el grupo de la administración del clon 2-13 (IgG2b de rata) (N = 10), no fue perfecto, pero la tasa de crecimiento del tumor se inhibió estadísticamente significativamente. Al decimocuarto día (día 14) después del inicio de la administración del anticuerpo, el volumen de los tumores del grupo de administración del clon 2-13 fue 832,9 ±

131,8 mm³ (P <0,01 mediante la prueba t de Student), mientras que fue de 1580,2 ± 179,4 mm³ en el grupo de control (N = 10). Por lo tanto, el clon 2-13 exhibió una actividad inhibidora del crecimiento del tumor de aproximadamente 50 % (Figura 3A).

Del mismo modo, en el grupo de administración del clon BA-1-3D (IgG2a de ratón) (N = 8) y el grupo de administración del clon 6-DI (IgG1 de ratón) (N = 8), el volumen del tumor fue de 380,8 ± 54,4 mm³ (Figura 3B) en el grupo de administración de BA 1-3D y de 321,0 ± 59,6 mm³ (Figura 3C) en el grupo de administración del clon DI-6, mientras que fue de 907,7 ± 142,8 mm³ en el grupo control (N = 8). Por lo tanto, el crecimiento del tumor se inhibió significativamente mediante ambos tipos de anticuerpos (P <0,01 por la prueba t de Student).

Además, también en el grupo de administración del clon M3-1 (IgG1 de ratón) (N = 8), la tasa de crecimiento del tumor fue significativamente inhibida. Al decimocuarto día (día 14) después del inicio de la administración, el volumen del tumor fue de 457,0 ± 123,75 mm³ en el grupo de clones administración de M3-1 (P <0,05 mediante la prueba t de Student), mientras que fue de 1.123,8 ± 249,1 mm³ en el grupo control (N = 7) (consulte la figura 3D y la Tabla 3).

Entre los clones mencionados anteriormente, un hibridoma que produce el clon M3-1 se denominó "hibridoma de ratón-ratón: M3-1," y se depositó en el Depositario de Microorganismos de Patentes NITE (NMPD), el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada, una Institución Administrativa Independiente del Ministerio de Economía, Comercio e Industria, (el AIST Tsukuba Central de 6, Higashi 1-1- 1, Tsukuba, Ibaraki, Japón, código postal: 305-8566), el 18 de octubre de 2006 (nº de acceso FERM BP-10707).

Un hibridoma que produce el clon DI-2-14 se denominó "hibridoma de ratón-ratón: M3-1," y se depositó en el mismo instituto nacional anterior el 21 de agosto de 2007 (nº de acceso FERM BP-10899).

Asimismo, un hibridoma que produce el clon DI-6 se denominó "hibridoma de ratón-ratón: M3-1," y se depositó en el mismo instituto nacional anterior el 21 de agosto de 2007 (nº de acceso FERM BP-10900).

Tabla 3

Grupo	N (Número de ratones)	Volumen tumoral (mm ³)	Tasa de crecimiento (veces)	Peso del tumor (g)
IgG de ratón (control)	8	907,7±142,8	9,42	0,58±0,07
DI-2-14	8	*175,5±46,5	1,85	*0,15±0,04
DI-6	8	*321,0±59,6	3,41	*0,37±0,06
BA-1-3D	8	*380,8±54,4	4,06	*0,34±0,06
IgG de ratón (control)	7	1123,8±249,1	9,61	n.e.
M3-1	8	**457,0±123,75	4,1	n.e.
IgG de rata (control)	10	1580,2±179,4	14,5	n.e.
2-13	10	*832,9±131,8	7,5	n.e.

4. Análisis de la actividad antitumoral en xenoinjertos de cáncer de colon humano (modelos de tratamiento)

Como en el caso de la utilización de los modelos de tratamiento de xenoinjerto de células de cáncer de hígado humano antes mencionados, se analizó la actividad antitumoral del clon 2-13 en los modelos de tratamiento de xenoinjerto de la línea celular de cáncer de colon humano (SW480-hDlk-1)(Figura 4).

En un grupo de administración del clon 2-13, el crecimiento tumoral se inhibió significativamente en comparación con un grupo control (un grupo de administración de IgG de rata). El día 16 (Día 16), el volumen del tumor fue de 452,71 ± 54,97 mm³ (que correspondían a 2,87, cuando se definió el valor en el día de iniciación administración como 1,0) en el grupo de administración del clon 2-13 (N = 8) (P <0,05 mediante la prueba t de Student), mientras que fue de 877,27 ± 176,82 mm³ (que corresponde a 5,01, cuando se definió el valor en el día de inicio de la administración como 1,0) en el grupo de administración de IgG de rata (N = 7) (Figura 4).

De los resultados anteriores, se puso de manifiesto que el anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 muestra una actividad significativa de inhibición del crecimiento tumoral in vivo, no sólo en las células de cáncer de hígado, sino también en células de cáncer de colon.

5. Actividad de unión a antígeno de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 (clones DI-2-14, 2-13, BA-1-3D, DI-6 y M3-1) (análisis FACS utilizando células HEK-293-hDlk-1 y cálculo de la constante de disociación por ELISA)

Con respecto a los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 que exhiben una actividad antitumoral significativa en modelos de xenoinjerto de células de cáncer humano, su afinidad por hDlk-1 como antígeno se analizó mediante FACS utilizando células HEK-293-hDlk-1 (Figura 5) y células Huh-7-hDlk-1 (Figura 6). Como resultado, se demostró que todos los clones reconocieron todas las líneas celulares y que reconocieron la estructura tridimensional de hDlk-1. Aunque no se dieron datos, ningún clon reconoció ninguna célula HEK293 y Huh-7 que no expresaron hDlk-1.

Posteriormente, la afinidad (constante de disociación) de estos clones por un antígeno se calculó por el método de ELISA mencionado anteriormente. Como resultado, el valor de K_d del clon DI-2-14 se encontró que era $9,26 \times 10^{-9}$ (M), la del clon M3-1 se encontró que era $6,28 \times 10^{-9}$ (M), la del clon BA-1-3D se encontró que era $32,2 \times 10^{-9}$ (M) y la del clon DI-6 se encontró que era $10,1 \times 10^{-9}$ (M). La afinidad del clon 2-13 por el HFA-1 recombinante purificado no fue alta y por lo tanto el valor K_d del mismo no pudo calcularse por el método antes mencionado.

6. Análisis del epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1

A continuación se llevó a cabo el análisis de epítipo de los anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1.

Cada uno de los vectores de expresión hDlk-1 (EGF 1-2) -pME-CHFX, hDlk-1 (EGF 1-3) -pME-CHFX, hDlk-1 (EGF 3-4) -pME-CHFX, hDlk-1 (EGF 4-6) -pME18-CHFX y hDlk-1 (EGF 5-6) -pME18-CHFX (Figura 7) se introdujo en células COS-7 y se sometieron a análisis FACS y a inmunotinción de las muestras Cytospin, para examinar los sitios en una región que contiene 6 motivos de tipo EGF existentes en la región FA-1 (región extracelular) de hDlk-1, que eran reconocidos por cada anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1.

Como resultado del análisis FACS y de la inmunotinción, se encontró que el clon DI-2-14 reconocía el EGF (1-3) y el EGF (3-4), pero que no reconocía en absoluto EGF (1-2), EGF (4-6) y EGF (5-6) (Figura 8). Se demostró que el epítipo reconocido por el clon de DI-2-14 puede ser una región que contiene el tercer motivo de tipo EGF (EGF-3) de hDlk-1 al 4º motivo de tipo EGF (EGF-4) del mismo (a región que comprende los aminoácidos en las posiciones 92 a 167 de hDlk-1) y que puede ser EGF-3 (una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 92 a 120 de hDlk-1). Se ha informado de que, entre los isotipos de IgG de ratón, IgG2a e IgG2b tienen una fuerte actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y que la ADCC de IgG1 es baja (consúltese Kipps, TJ et al., 1985). El isotipo del clon DI-2-14 es IgG1 de ratón. Por lo tanto, se demostró que la extremadamente fuerte actividad inhibidora del crecimiento tumoral del clon DI-2-14 está mediada por la inhibición de las funciones de hDlk-1 en lugar de una actividad citotóxica de células de cáncer a través de células efectoras, tales como la actividad ADCC. Por lo tanto, se demostró que una región que contiene EGF-3 y EGF-4 de hDlk-1 y, en particular, EGF-3 es un dominio especialmente importante para las funciones de hDlk-1.

Por otra parte, los clones 2-13, DI-6 y BA-1-3D reconocieron EGF (1-2) y EGF (1-3), pero no reconocieron en absoluto EGF (3-4) y EGF (4-6) (Figura 9). Se ha demostrado que los epítipos reconocidos por los tres clones anteriores son una región que contiene el primer motivo de tipo EGF (EGF-1) al segundo motivo de tipo EGF (EGF-2) de hDlk-1 (una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 26 a 85 de hDlk-1). Por lo tanto, se demostró que la región que contiene el EGF-1 y EGF-2 de hDlk-1 es un dominio especialmente importante para las funciones de la hDlk-1.

Además, el clon M3-1 reconoció EGF (1-4) y EGF (4-6), pero no reconoció EGF (1-2), EGF (1-3) y EGF (3-4) (Figura 10). Se ha demostrado que el epítipo reconocido por el clon M3-1 es una región que contiene el 4º motivo de tipo EGF (EGF-4) al sexto motivo de tipo EGF (EGF-6) de hDlk-1 (una región que comprende los aminoácidos en las posiciones 131 a 244 de hDlk-1). Por lo tanto, se demostró que la región que contiene el EGF-4, EGF-5 y EGF-6 de hDlk-1 es un dominio especialmente importante para las funciones de la hDlk-1.

7. Actividad de internalización del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

Los clones del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 producidos se clasificaron de acuerdo con los epítipos reconocidos por los clones. En cuanto a los clones así clasificados pertenecientes a varios grupos, se examinó su actividad de internalización tras el reconocimiento de antígenos.

Con respecto al clon M1-290 que reconoce EGF (1-2), el clon M3-1 que reconoce EGF (4-6) y el clon M3-4 que reconoce EGF (5-6), cada anticuerpo se dejó reaccionar con células HEK293-hDlk-1, seguido de incubación a 37 °C. A continuación, se dejó reaccionar con un anticuerpo anti-ratón marcado con PE. Como se muestra en la Figura 11A, cuando se definió la intensidad de fluorescencia obtenida sin incubación como el 100 %, en comparación con otros clones, la intensidad de fluorescencia del clon M3-1 se redujo a una velocidad significativamente rápida, dependiendo del tiempo de incubación. Este resultado demostró que, después de la finalización de una reacción antígeno-anticuerpo, la cantidad de un complejo antígeno-anticuerpo en la superficie celular se reduce internalizándose en las células en función del tiempo. La intensidad de la fluorescencia después de cada tiempo de incubación es como sigue.

60 minutos; M3-1: 38,7 %, M1-290: 52,1 %, M3-4: 74,1 %
90 minutos; M3-1: 36,9 %, M1-290: 47,1 %, M3-4: 71,15 %
120 minutos; M3-1: 28,1 %, M1-290: 36,3 %, M3-4: 57,3 %
240 minutos; M3-1: 12,2 %, M1-290: 31,2 %, M3-4: 41,4 %

Se confirmó que el factor de reducción de la intensidad media de fluorescencia después de la incubación no es la eliminación del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 a partir de un antígeno, que se ha unido al antígeno durante la incubación. El clon M3-1 se marcó directamente con FITC y luego se dejó reaccionar con células HEK293-hDlk-1 de la misma manera que se ha indicado anteriormente. Después de lavar con PBS, se incubó a 37 °C durante 120

minutos. A continuación, el análisis de FACS se llevó a cabo y la intensidad de fluorescencia obtenida inmediatamente después de la reacción se comparó con la intensidad de fluorescencia obtenida después de los 120 minutos incubación. Como resultado, no hubo diferencia significativa entre los dos tipos de intensidad de fluorescencia (sin incubación: 100 %; 120 minutos después de la incubación: 110,9 %) (Figura 11B).

Posteriormente, los anticuerpos marcados con rodamina se dejaron reaccionar con células HEK293-hDlk-1. Después de lavar con PBS, se incubó a 37 °C en la misma forma anterior. Después se prepararon preparaciones de frotis utilizando Cytospin y la localización del anticuerpo marcado con fluorescencia se observó bajo un microscopio de fluorescencia. Como resultado, como se muestra en la Figura 12, sin incubación, se observó la localización del anticuerpo en la membrana celular. Sin embargo, en el caso de los clones M3-1 y DI-1 que reconocen EGF (4-6), los clones se incorporaron en las células debido a la endocitosis por incubación a 37 °C durante sólo 15 minutos y después se incorporaron en vesículas, por lo que se observó la localización intracelular de los clones como puntos. Por otro lado, en el caso de los clones M1-290 y M3-4, la mayoría de ellos se localizó en la membrana celular, aunque se observó la localización tales como puntos (Figura 12).

A partir de los resultados anteriores, se encontró que los anticuerpos que reconocen EGF (4-6), tales como el clon M3-1, tenían una actividad significativamente alta de internalización después del reconocimiento de antígenos, en comparación con otros anticuerpos que reconocen otros dominios. En consecuencia, dado que un inmunoconjugado de un anticuerpo anti-hDlk-1, tales como el clon M3-1 y un agente anticanceroso o citotoxina se incorporan rápidamente en una célula diana, se considera que el inmunoconjugado exposiciones un alto efecto farmacológico del agente anticanceroso o citotoxina y que tiene algunos efectos secundarios.

8. Actividad citotóxica del inmunoconjugado del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1

Se dejó que la saporina se uniera a cada uno del clon M3-1 que tiene una alta actividad de internalización y del clon M1-290 utilizado como un control, a fin de preparar inmunoconjugados (M3-1-SAP y M1-290-SAP). Por lo tanto, se evaluaron los efectos farmacéuticos de estos inmunoconjugados y por lo tanto se analizó la eficacia de una terapia de misiles utilizando un inmunoconjugado del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1. Ni M3-1-SAP ni M1-290-SAP mostraron en absoluto toxicidad para las células HEK293 que no expresaban hDlk-1.

Posteriormente, se añadieron estos inmunoconjugados a las células Huh7-hDlk-1 y las células SK-N-F1 (neuroblastoma que expresa hDlk-1 endógeno) que expresaban hDlk-1 y se cultivaron a continuación. Como resultado, un control (IgG-SAP de ratón) no mostró casi ninguna actividad citotóxica en todas las células. Sin embargo, cuando se añadió M3-1-SAP a la solución de cultivo y se cultivó luego, las células resultaron dañadas de un modo dependiente de la concentración. En el caso de una concentración de 1 µg / ml, se encontró que la tasa de supervivencia era de $23,3 \pm 1,35$ % (N = 3) en las células el Huh-7-hDlk-1 y se encontró que era de $9,38 \pm 2,1$ % (n = 3) en las células SK-N-F1. Por lo tanto, M3-1-SAP exhibió una fuerte actividad citotóxica (Figura 13).

La actividad citotóxica de M3-1-SAP en las células SK-N-F1 (neuroblastoma que expresa hDlk-1 endógeno) se comparó con la actividad citotóxica de M1-290-SAP en las mismas células anteriores. Como resultado, como se muestra en la Figura 13B, las actividades de estos inmunoconjugados eran casi equivalentes entre sí (Figura 13B).

9. Actividad inhibidora del crecimiento tumoral in vivo de inmunoconjugados de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1

La eficacia de M3-1-SAP como un inmunoconjugado, a saber, su actividad antitumoral y los efectos secundarios que ocurren cuando se administra a ratones individuales, se evaluó utilizando modelos de xenoinjerto de células Huh-7-hDlk-1. M1-290-SAP se utilizó como control. La actividad antitumoral se evaluó basándose en el volumen del tumor de la misma manera que se ha descrito anteriormente. Los efectos secundarios se analizaron con base en un cambio en el peso corporal y una tasa de mortalidad después de la administración de dichos inmunoconjugados:

En un grupo de administración de IgG de ratón (N = 8), no se observó un aumento o disminución en el peso corporal en todo el periodo de ensayo (14 días). Por otro lado, en un grupo de administración de M3-1-SAP (5 mg / kg de peso corporal, administración intraperitoneal) (N = 8) y un grupo de administración de M1-290-SAP (5 mg / kg de peso corporal, administración intraperitoneal) (N = 8), se observó una disminución en el peso corporal al cuarto día (Día 4) después del inicio de la administración de cada inmunoconjugado (en el caso de "M3-1-SAP," Día 1: $21,2 \pm 1,36$ (g), Día 4: $18,5 \pm 1,44$ (g); en el caso de "M1-290-SAP," Día 1: $21,13 \pm 0,81$ (g), Día 4: $17,9 \pm 0,85$ (g)). En particular, la toxicidad de M1-290-SAP que tiene una baja actividad de internalización era fuerte, dos de los ocho ratones murieron al cuarto día (día 4) y los seis restantes ratones murieron al quinto día (día 5). Por lo tanto, como resultado, 5 días después del inicio de la administración, todos los ratones murieron (Figura 14B).

Por otra parte, todos los ratones en el grupo de administración M3-1-SAP sobrevivieron y su peso corporal se recuperó después del octavo día (Día 8).

También, como se muestra en la Figura 15, el crecimiento tumoral se inhibió en el grupo de administración de M3-1-SAP. Al decimocuarto día (Día 14), el volumen del tumor en el grupo de control se encontró que era de $1123,8 \pm$

245,65 mm³, mientras que el volumen del tumor en el grupo de administración de M3-1-SAP se encontró que era de 415,8 ± 105,1 mm³ (P < 0,05 prueba t de Student) (el inmunoc conjugado se administró dos veces, el día 1 y el día 4).

Por otra parte, con el fin de confirmar la actividad antitumoral de M3-1-SAP, M3-1-SAP se administró localmente a una porción del tumor (1 mg / ml de M3-1-SAP, 40 µl / tumor). M3-1-SAP y la IgG control se administraron dos veces, a saber, en el punto de tiempo donde el volumen del tumor se convirtió en un volumen predeterminado (grupo control: 144,98 ± 6,1 mm³ (N = 5); grupo de M3-1-SAP: 145,87 ± 21,26 mm³ (N = 5)) y al cuarto día (día 4) después del inicio de la administración. Después se observó el crecimiento de volumen del tumor.

Como resultado, como se muestra en la Figura 17A, en el grupo de administración de M3-1-SAP, el crecimiento de tumor fue casi completamente inhibido hasta el séptimo día (Día 7) (grupo de control: 584,02 ± 137,07 mm³; grupo de M3-1-SAP: 148,67 ± 38,0 mm³; * P < 0,01 (mediante prueba t de Student). Incluso al decimocuarto día, el volumen del tumor en el grupo de administración de M3-1-SAP se encontró que era de 575,75 ± 216,61 mm³ (P < 0,05 por la prueba t de Student), mientras que el volumen del tumor en el grupo de control se encontró que era de 2038,66 ± 333,17 mm³. Por lo tanto, M3-1-SAP exhibió una actividad antitumoral extremadamente fuerte.

Como se muestra en la Figura 16B, incluso en el caso de la administración intratumoral de M3-1-SAP, después de la segunda administración al cuarto día (Día 4), todos los ratones sobrevivieron, aunque se observó ligeramente su reducción de peso corporal. Después del noveno día (día 9), su peso se recuperó poco a poco y el décimo día (día 10) se recuperó por completo a una condición normal antes de la administración.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 16C, cuando un agente anticanceroso existente, cisplatino, (agente antitumores malignos, Randa Injection; ; Nippon Kayaku Co., Ltd.) se administró, el crecimiento del tumor fue casi completamente inhibido por la administración de 5 mg / kg del agente (a los 16 días, el grupo de control (grupo PBS): 1085,36 ± 286,30 mm³; Grupo de cisplatino: 77,28 ± 15,20 mm³; * P < 0,01 (mediante prueba t de Student). Sin embargo, como se muestra en la Figura 16D, en el grupo de administración de cisplatino se observó una disminución significativa del peso corporal con el tiempo. Al decimosexto día (Día 16), el peso corporal de los ratones en el grupo de administración de cisplatino se encontró que era de 13,24 ± 1,83 g (P < 0,01 por la prueba t de Student), mientras que se encontró que el peso corporal de los ratones en el grupo control era de 20,58 ± 0,53 g. Por lo tanto, se observó un efecto secundario significativamente fuerte (reducción de peso corporal).

Los resultados anteriores demostraron que, cuando el clon M3-1 que tiene una actividad alta de internalización (un anticuerpo que reconoce EGF (4-6)) se utiliza como inmunoc conjugado, tiene pocos efectos secundarios y una alta actividad antitumoral, cuando se compara con otros clones.

10. Expresión de hDlk-1 en tejidos de cáncer de colon humano y tejidos de cáncer de mama

Previamente se ha informado de que hDlk-1 se expresa en cánceres sólidos tales como tumor neuroendocrino, neuroblastoma, glioma, neurofibromatosis de tipo 1, el cáncer de pulmón microcítico, cáncer de hígado, cáncer de riñón y cáncer de ovario y en cánceres de la sangre tales como el síndrome mielodisplásico y leucemia mielocítica aguda.

Con el fin de examinar la expresión de hDlk-1 en cánceres distintos de los cánceres antes mencionados, una matriz comercialmente disponible de tejido de cáncer humano se inmunotizó con un anticuerpo anti-hDlk-1 y se analizó la expresión de hDlk-1 en diversos cánceres.. Se examinó la tasa positiva de hDlk-1 en el cáncer de colon mediante una matriz de tejido de cáncer de colon (Cybrdi; lote n° CC05-01-001). La Figura 17 muestra fotografías representativas teñidas. Se examinaron setenta muestras de tejidos de cáncer de colon. Como resultado, en el caso de adenocarcinoma, 12 de 43 muestras (27,9 %) fueron fuertemente positivas y 19 muestras de del mismo (44,2 %) fueron débilmente positivas. En tales casos de adenocarcinoma en su conjunto, 31 de los 43 analitos (72,1 %) eran positivos a hDlk-1 (consulte la Tabla 4).

Por otra parte, en el caso de 11 muestras de adenocarcinoma papilar en la misma matriz de tejido, 6 analitos (54: 5 %) fueron muy positivos para hDlk-1 (consulte la Tabla 4).

Tabla 4

Adenocarcinoma	Negativo para hDlk-1	Débilmente positivo para hDlk-1	Fuertemente positivo para hDlk-1
Grado I	0	2	1
Grado II	4	13	8
Grado III	8	4	3
Total	12	19	12

Adenocarcinoma papilar	Negativo para hDlk-1	Débilmente positivo para hDlk-1	Fuertemente positivo para hDlk-1
Grado I	0	3	3
Grado II	1	2	3
Grado III	0	0	0
Total	1	5	6

Se examinó la tasa positiva de hDlk-1 en el cáncer de mama mediante una matriz de tejido de cáncer de mama (Cybrdi; lote nº CC08-02-002). Esta matriz de tejido se compone de un total de 63 secciones recogidas de 53 muestras y 17 muestras (17 secciones) del mismo se derivan de carcinoma ductal infiltrante, 2 muestras (2 secciones) del mismo se derivaron de carcinoma intraductal, 34 muestras (44 secciones) del mismo se obtuvieron de tejidos normales o de tejidos no cancerosos tales como fibras de colágeno. Sin embargo, su nivel de tinción era extremadamente bajo, aunque el hDlk-1 fue débilmente positivo en las muestras de tejidos de las glándulas mamarias normales (Figura 18). Por otra parte, 5 de cada 17 muestras (29 %) de carcinoma ductal infiltrante eran fuertemente positivas para hDlk-1 (por favor consúltese la Figura 18, la Tabla 5).

Tabla 5

Carcinoma ductal infiltrante	Negativo para hDlk-1	Débilmente positivo para hDlk-1	Fuertemente positivo para hDlk-1
Grado I	1	0	0
Grado II	7	3	5
Grado III	0	1	0
Total	8	4	5

Carcinoma intraductal (2 analitos): fuertemente positivo para hDlk-1 (1), negativo para hDlk-1 (1)

Glándula mamaria normal, fibras de colágeno, etc. (34 analitos): negativo para hDlk-1 (24), débilmente positivo para hDlk-1 (10)

Se hizo evidente que hDlk-1 se expresaba fuertemente en aproximadamente el 30 % tanto de cáncer de colon como del cáncer de mama, así como en los cánceres que expresan hDlk-1 previamente conocidos. Como se describe en el ejemplo mencionado anteriormente, un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 exhibió actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de células de cáncer de colon, así como en modelos de xenoinjerto de células de cáncer de hígado. Por lo tanto, el anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 se convierte en un agente terapéutico eficaz para el cáncer de colon, así como para cáncer de hígado. Del mismo modo, también se convierte en un agente terapéutico eficaz que se dirige al cáncer de mama u otras células de cáncer que expresan hDlk-1.

[Ejemplo 2]

1. Actividad antitumoral dependiente de la dosis de anticuerpo de ratón anti-hDlk-1 (clon DI-2-14) en modelos de tratamiento de xenoinjerto de la línea celular de cáncer de hígado que expresa hDlk-1 (células Huh-7-Dlk-1)

<Objetivo>

Como se ha descrito en el Ejemplo 1, el clon DI-2-14 (IgG1 de ratón) que es un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 exhibió una actividad antitumoral extremadamente alta, a una dosis de 20 mg / kg de peso corporal, en los modelos de tratamiento de xenoinjertos de la línea celular de cáncer de hígado humano (células Huh-7-Dlk-1). Por lo tanto, con el fin de examinar más la actividad antitumoral del clon DI-2-14 se evaluó la actividad antitumoral dependiente de la dosis.

<Método>

La actividad antitumoral se evaluó de la misma manera que se ha descrito en el Ejemplo 1, excepto que se cambió la dosis del anticuerpo.

<Resultados>

Como se muestra en la Figura 19, el crecimiento de tumor se inhibió de forma dependiente de la dosis mediante la administración del clon DI-2-14. Al octavo día (Día 8) después de la administración del anticuerpo, el volumen del tumor se encontró que era de $522,76 \pm 107,9 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de DI-2-14 (1 mg / kg) (N = 9), se encontró que era de $309,2 \pm 58,9 \text{ mm}^3$ en el grupo de administración de DI-2-14 (2 mg / kg) (N = 9) y se encontró que era de $285,8 \pm 38,2 \text{ mm}^3$ en el DI-2-14 (/ kg 5 mg) grupo de administración (N = 9). Por el contrario, en el grupo control (N = 9), el volumen del tumor se encontró que era de $782,1 \pm 124,4 \text{ mm}^3$.

2. Actividad antitumoral de del anticuerpo anti-hDlk-1 de ratón (clon DI-2-14) en los modelos de tratamiento de xenoinjerto de SK-N-Ficell de neuroblastoma humano

<Objetivo>

Como se ha descrito en el Ejemplo 1, entre 5 tipos de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 que exhiben una actividad antitumoral en los modelos de xenoinjerto de tratamiento de la línea celular de cáncer de hígado humano (células Huh-72-hDlk-1 con respecto a la al clon DI-2-14 (IgG1 de ratón) que presenta una actividad anti-tumor, se evaluó su actividad antitumoral particularmente fuerte en los modelos de xenoinjerto tratamiento del neuroblastoma humano (células SK-N-F1). Las células Huh-7-hDlk-1 se consideran que son una línea celular, donde se permitió que un gen de hDlk-1 se expresara exógenamente de forma estable en células Huh-7. Por el contrario, las células SK-N-F1 se considera que son una línea celular, donde hDlk-1 se expresa de forma endógena en la superficie celular de las mismas. En consecuencia, un fenómeno por el cual el clon DI-2-14 muestra una actividad antitumoral en un modelo de xenoinjerto de tratamiento de la línea celular SK-N-F1 cuando se administra a la misma es idéntico a un fenómeno por el cual un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 exhibe su efecto farmacéutico en células de neuroblastoma humano. Al mismo tiempo, también se puede decir que el anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 (en particular, el clon DI-2-14) es eficaz para (exhibe su efecto farmacéutico en) varios tipos de células cancerosas, que expresan hDlk-1 en la superficie celular.

<Método>

El neuroblastoma humano (células SK-N-F1; catálogo ATCC N° CRL2142) que expresan endógenamente hDlk-1 en la superficie celular se eliminó mediante un tratamiento con tripsina y después se preparó una suspensión de células (6×10^7 células / ml) con PBS. La suspensión se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l (3×10^6 células) de la mezcla en el flanco derecho de cada ratón con inmunodeficiencia grave combinada (NOD-scid). De diez a catorce días después del trasplante de las células cancerosas, los ratones cuyo volumen tumoral había crecido hasta de 50 a 150 mm³ (valor medio: 100 mm³) se dividieron en varios grupos. El día donde los ratones se dividieron en varios grupos se definió como un primer día (Día 1) y se inició la administración de un anticuerpo (clon DI-2-14). El anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a intervalos de una vez cada 3 días (5 mg / kg de peso corporal, 20 mg / kg de peso corporal). Como con el ejemplo 1, la actividad antitumoral se evaluó midiendo el volumen del tumor. Además, el último día del experimento, el tumor se extirpó por una autopsia y el peso del tumor se midió y evaluó. Se llevó a cabo una prueba de diferencia significativa mediante la prueba t de Student y se determinó que P <0,05 era estadísticamente significativa.

<Resultados>

Como se muestra en la Figura 20A, en el caso del grupo de administración del clon DI-2-14 (IgG1 de ratón), el crecimiento tumoral se inhibió significativamente tanto en el grupo de administración de 5 mg / kg (N = 8) como en el grupo de administración de 20 mg / kg (N = 7), cuando se compara con el grupo control (N = 7). En particular, en el grupo de administración de 20 mg / kg (N = 7), desde el día siguiente al del inicio de la administración al día 23 (Día 23) donde se completó el experimento, el volumen del tumor en relación con los mismos días anteriores fue estadísticamente significativamente pequeño (P <0,01 mediante la prueba t de Student).

El día 23 (día 23) después del inicio de la administración, el volumen del tumor se encontró que era de $333,8 \pm 6,8$ mm³ (P <0,01 mediante la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14 (5 mg / kg de peso corporal) y se encontró que era de $233,0 \pm 16,4$ mm³ (P <0,01 por la prueba t de Student) en el del clon DI-2-14 (20 mg / kg de peso corporal), mientras que se encontró que era de $527,8 \pm 48,9$ mm³ en el grupo de control. Por lo tanto, la actividad antitumoral dependiente de la dosis del clon DI-2-14 se confirmó (DI-2-14 (5 mg / kg) frente a DI-2-14 (20 mg / kg), Día 23, P <0,01 por la prueba t de Student).

El peso del tumor escindido se encontró que era de $0,03 \pm 0,009$ (g) (P <0,05 mediante la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14 (5 mg / kg de peso corporal) y se encontró que era de $0,02 \pm 0,005$ (g) (P <0,05 por la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14 (20 mg / kg de peso corporal), mientras que se encontró que era de $0,07 \pm 0,04$ (g) en el grupo de control. Como en el caso del volumen tumoral, hubo una diferencia significativa en el peso del tumor entre el grupo de administración del clon clone ID-2-14 5 mg / kg y en el grupo de administración de 20 mg / kg del clon DI-2-14 (P <0,05 prueba t de Student). Por lo tanto, se confirmó una actividad antitumoral dependiente de la dosis (Figura 20B).

3. Determinación de la secuencia de la región variable del gen de anticuerpo del anticuerpo anti-hDlk-1 de ratón (clon DI-2-14) y la construcción de vector de expresión químérico DI-2-14

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 de ratón se cultivaron en un medio DMEM que contenía suero bovino fetal al 10 % a 37 °C en una incubadora de CO₂ 7,5 %. El ARN total se extrajo de 3×10^6 hibridomas, usando un reactivo Trizol (Invitrogen). A continuación, empleando el Kit GeneRacer (Invitrogen), el ADNc se sintetizó de acuerdo a un método incluido en el kit, usando cebadores oligo dT. Un gen que codifica cada una de las regiones variables de la cadena de la cadena H y la cadena L (VH y VL) del clon DI-2-14 (IgG1 de ratón) se clonó mediante un método de PCR usando el ADNc sintetizado como molde y se usó un cebador incluye con el Kit GeneRacer como un cebador en 5'. Por otro lado, con respecto a un cebador 3', un cebador que tiene una

secuencia complementaria a una región constante $\gamma 1$ de ratón se utiliza como cebador 3' utilizado en la amplificación de la VH y un cebador que tiene una secuencia complementaria a una región constante κ de ratón se utiliza como un cebador 3' utilizado en la amplificación de VL.

5 Cebador 5' (cebador F):

5'-cgactggagcacgaggacactga-3' (SEC ID N° 15)

Cebador 3' (cebador R):

VH: 5'-gccagtggatagacagatgg-3' (SEC ID N° 16)

10 VL: 5'-gatggatacagttggtgcagc-3' (SEC ID N° 17)

Usando cada uno de los cebadores anteriormente mencionados, se llevó a cabo la PCR con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción.

15 «Composición de la solución de reacción»

ADNc molde:	1,5 μ l
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 μ l
dNTP 2 mM	5 μ l
Polimerasa ThermalAce	0,5 μ l
Cebador F (10 μ M)	3 μ l
Cebador R (10 μ M)	1,5 μ l
Agua esterilizada	33,5 μ l
Total:	50 μ l

<<Condiciones de la reacción>>

20 Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (10 s) → Hibridación: 55 °C (10 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

25 El ADNc de cada uno de las VH y VL sintetizadas se subclonó en un vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) y la secuencia de nucleótidos de los mismos se determinó a continuación. Las secuencias de nucleótidos de varios clones de VH y clones de VL se determinaron y se identificaron las secuencias de nucleótidos típicos de las regiones variables de la cadena H y la cadena L de ratón. Las figuras 21 y 22 muestran las secuencias de cana consenso de la VH y VL de DI-2-14 y las secuencias de aminoácidos putativos.

30 Posteriormente, a las regiones codificantes de VH y VL, se añadieron señales de donante de corte y empalme derivadas de la línea germinal de ratón JH- y J κ , cada una correspondiente a las regiones antes mencionadas, respectivamente. A continuación, se añadieron adicionalmente secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción adecuadas utilizadas para la inserción en un vector de expresión de células animales en ambos extremos. Los genes de la VH (Figura 23) y la VL (Figura 24) producidas de este modo que tienen funciones como exones se insertaron en un vector de expresión de células animales (Figura 25) que tienen las regiones constantes de cadena $\gamma 1$ humana y la cadena κ , a fin de producir un vector de expresión de anticuerpo quimérico de ratón-humano (DI-2-14 IgG1/ κ) (pChDI-2-14).

4. Diseño del DI-2-14 humanizado y la construcción del vector de expresión

40 Se llevó a cabo la humanización de un anticuerpo DI-2-14. Las regiones variables (VH y VL) de DI-2-14 se humanizaron de acuerdo con el método de Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 10029-10033, 1989).

45 En primer lugar, el modelado molecular de las estructuras tridimensionales de las regiones variables de DI-2-14 se llevó a cabo utilizando ordenadores. Posteriormente, se realizó una búsqueda de homología entre las regiones variables de DI-2-14 y las secuencias de la región variable de genes de anticuerpos humanos, así como para seleccionar U00583 (número de acceso GenBank) como aceptor para proporcionar una región marco (FR) necesaria para la humanización la VH de DI-2-14. Al mismo tiempo, X72467 (número de acceso en GenBank) se seleccionó como un aceptor para proporcionar una región marco (FR) necesaria para la humanización de la VL de DI-2-14.

50 La Figura 34 muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de la VH de DI-2-14, dos tipos de VH de DI-2-14 humanizado y el aceptor humano (U00583). Como resultado de la modelización por ordenador, se supuso que los residuos de aminoácidos existentes en las regiones marco (FR) de ratón indicadas con doble subrayado son significativamente adyacentes a las regiones CDR (CDR 1 a 3) indicadas con subrayado. Por lo tanto, para el diseño de humanización, dado que los residuos de aminoácidos indicados con doble subrayado (27 (F), 28 (N), 29 (I), 30 (R), 48 (I), 66 (K), 67 (A), 73 (T) y 82 (F)), los de la VH de DI-2-14 de ratón fueron retenidas y otras regiones FR se sustituyeron con las del aceptor humano (U00583), a fin de producir VH # 1 (Hudi-VH 2-14 # 1) de DI-2-14 humanizado. Por otro lado, con el fin de reducir la antigenicidad potencial de Hudi-2-14 VH # 1, sólo el residuo de aminoácido (F) en la posición 82, que se predijo que tenía una interacción relativamente débil con la CDR, se

sustituyó con el residuo de aminoácido (L) en la región FR correspondiente al aceptor humano (U00583), a fin de producir la VH # 2 de DI-2-14 humanizado (Hudi-2-14 VH # 2).

Del mismo modo, la Figura 35 muestra la alineación de los residuos de aminoácidos de VL de DI-2-14, la VL humanizada de DI-2-14 y el aceptor humano (X72467). En el caso de la VL humanizada de DI-2-14, las secuencias de las CDR (CDR 1 a 3) indicadas con subrayado permanecieron. Con respecto a sólo dos residuos de aminoácidos existentes en la región FR, a saber, (F) en la posición 36 y (A) en la posición 70, los derivados de ratón se conservaron y otras regiones FR fueron sustituidas con el aceptor humana (X72467), a fin de producir VL humanizado HuDI-2-14 (Hudi-2-14 VL).

Las figuras 36A, 37A y 38A muestran las secuencias de nucleótidos de Hudi-2-14 VH # 1 (Figura 36A), Hudi-2-14 VH # 2 (Figura 37A) y Hudi-2-14 VL (Figura 38A) y las supuestas secuencias de aminoácidos. Un gen que codifica cada uno de Hudi-2-14 VH # 1, Hudi-2-14 VH # 2 y Hudi-2-14 VL se diseñó como un exón, que comprende una secuencia de péptido señal (las secuencias de señales de VH y VL de DI-2-14 de ratón), una señal donante de corte y empalme (derivada de la correspondiente línea germinal humana de secuencias JH y Jk) y sitios de restricción adecuados para la inserción en un vector de expresión de células animales se añadieron ambos extremos terminales.

Un gen de Hudi-2-14 VH # 1 y un gen de Hudi-2-14 VL se construyeron mediante síntesis y elongación de acuerdo con el método de PCR utilizando como cebadores, múltiples oligonucleótidos sintéticos que incluyen secuencias superpuestas, como se describe a continuación (He et al., J. Immunol, 160.: 1029-1035, 1998).

"gen de HuDI-2-14 VH#1"

La PCR se llevó a cabo usando, como molde un producto obtenido por mezcla de los ADNc oligosintéticos (JNJ102 a JNJ113: SEC ID N° 48 a 59) como se muestra en la Tabla 6 a continuación y también usando JNJ120 (SEC ID N° 65) como se muestra en la misma tabla como cebador F y JNJ115 (SEC ID N° 60) como se muestra en la misma tabla que un cebador R, con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción.

«Composición de la solución de reacción»

JNJ102 a JNJ113 (12 ADNc de oligo, cada uno de 1 µM):	1 µl
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Polimerasa ThermalAce	1 µl
Cebador flanqueante JNJ120 (10 µM):	1 µl
Cebador flanqueante JNJ 115 (10 µM):	1 µl
Agua esterilizada	40 µl
Total:	50 µl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (10 s) → Hibridación: 55 °C (20 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (20 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

"gen de HuDI-2-14 VL"

La PCR se llevó a cabo usando, como molde un producto obtenido por mezcla de los ADNc oligosintéticos (JNJ090 a JNJ101: SEC ID N° 36 a 47) como se muestra en la Tabla 6 a continuación y también usando JNJ116 (SEC ID N° 61) como se muestra en la misma tabla como cebador F y JNJ117 (SEC ID N° 62) como se muestra en la misma tabla que un cebador R, con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción. La relación de posición entre la secuencia del gen de Hudi-2-14 VH # 1 y los cebadores F y R cebadores mencionados anteriormente se muestra en la Figura 38B.

<<Composición de la solución de reacción>>

JNJ090 a JNJ101 (12 ADNc de oligo, cada uno de 1 µM):	1 µl
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 µl
dNTP 10 mM	1 µl
Polimerasa ThermalAce	1 µl
Cebador flanqueante JNJ116 (10 µM):	1 µl
Cebador flanqueante JNJ117 (10 µM):	1 µl
Agua esterilizada	40 µl
Total:	50 µl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (20 s) → Hibridación: 55 °C (20 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (20 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

5

Tabla 6

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (secuencia del oligo ADNc)	Observaciones	SEC ID N°
JNU090	5'-GGGCTAGCACCAACCATGAGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGCTGCTTGCTCTGG-3'	HuD-2-14VL oligo #1, F	36
JNU091	5'-CTGAGTCATCACAATATCCCAATGGCTCCAGGATCCAGCATCCAGCAAGCAGCCCCA-3'	HuD-2-14VL oligo #2, R	37
JNU092	5'-GGATATTGTGATGACTCAGTCCACTCTCTCTGCTCTGACTCCTGGAGAGCCG-3'	HuD-2-14VL oligo #3, F	38
JNU093	5'-CAGGAGACTCTTGCTAGACCTGCGAGAGATGGAGGCGGCTCTCCAGGAGTGACAG-3'	HuD-2-14VL oligo #4, R	39
JNU094	5'-CTAGCAAGAGTCCCTGCATAGTAATGGAACACACTACTGTATTGGTTCTCTGCAG-3'	HuD-2-14VL oligo #5, F	40
JNU095	5'-CCGATATATCAGGAGCTGAGGAGACTGGCTGCTCTGCAGGAACCAATACAAGT-3'	HuD-2-14VL oligo #6, R	41
JNU096	5'-CTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTC-3'	HuD-2-14VL oligo #7, F	42
JNU097	5'-TTTCAGTGTGAAGCAGTCTCTGACCCACTGCCACTGAACCTGTGTCTGGGACTCCG-3'	HuD-2-14VL oligo #8, R	43
JNU098	5'-GAACTGCTTTCACACTGAAATCAGTAGAGTGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTAT-3'	HuD-2-14VL oligo #9, F	44
JNU099	5'-GAAOGTGAATGGATATCTACATGTTGCATACAGTAATAAACACACATCCTCAG-3'	HuD-2-14VL oligo #10, R	45
JNU100	5'-TAGAATATCCATTCACTGCGCCCAAGGACAAAGGTGAAATCAAACGTGAGTAG-3'	HuD-2-14VL oligo #11, F	46
JNU101	5'-GGGGAATTCCTTAAATTTCTACTACGTTTGATTTCCA-3'	HuD-2-14VL oligo #12, R	47
JNU102	5'-GGGACTAGTACCACATGAAATGCAGCTGGGTACTCTCTCTGATGGCAGTGGTT-3'	HuD-2-14VL oligo #1, F	48
JNU103	5'-AGACTGCACCAAGCTGAACCTGTGAATGACCCCGTAACCACTGCCATCAGGAAGA-3'	HuD-2-14VL oligo #2, R	49
JNU104	5'-AGGTTCAAGTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAGAGCCAGGGTCTCTCAGTCAAG-3'	HuD-2-14VL oligo #3, F	50
JNU105	5'-GTCCTAATGTTGAAGCCAGAGGCTTGCAGGAGACCTTGACTGAGGACCCCTGGCT-3'	HuD-2-14VL oligo #4, R	51
JNU106	5'-CTGGCTCAACATTAGAGACACCTATATACACTGGGTGGGCGAGGCCCTGGACAG-3'	HuD-2-14VL oligo #5, F	52
JNU107	5'-ACCATTCGGAGGATCAATCCTTCCAAATCCACTCCAGGCCCTGCCAGGGGCTGCC-3'	HuD-2-14VL oligo #6, R	53
JNU108	5'-TTGATCCTCCGAATGGTAATCTTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACT-3'	HuD-2-14VL oligo #7, F	54
JNU109	5'-CATGTAGGCTGTGCTCGTGATGTCTGTGTTATAGTGGCCTTGCCCTGGAACT-3'	HuD-2-14VL oligo #8, R	55
JNU110	5'-CCACGAGCACAGCCTACATGGAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTC-3'	HuD-2-14VL oligo #9, F	56
JNU111	5'-AGCAAAGGAGTAACCATCAGACCTGCACAGTAATAGACGGGAGTGTCTCTCAGATC-3'	HuD-2-14VL oligo #10, R	57
JNU112	5'-CTGATGGTTACTCCTTGTCTACGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA-3'	HuD-2-14VL oligo #11, F	58
JNU113	5'-GGGAAGCTTTACAGCAGACTCACTGAAGAGACAGTGACCAGAG-3'	HuD-2-14VL oligo #12, R	59
JNU115	5'-GGGAAGCTTTACAGCAGACT-3'	HuD-2-14 VL extremo 3'	60
JNU116	5'-GGGCTAGCACCAACCATGAGG-3'	HuD-2-14 VL extremo 5'	61
JNU117	5'-GGGGAATTCCTTAAATTTCTA-3'	HuD-2-14 VL extremo 3'	62
JNU118	5'-CAGGCTGCTCAGCTCCATGTAGGCTGT-3'	HuD-2-14 VH#2 mutación puntual ascendente	63
JNU119	5'-TACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCT-3'	HuD-2-14 VH#2 mutación puntual descendente	64
JNU120	5'-GGGACTAGTACCACCACCATGAAATGCAGC-3'	HuD-2-14 VH extremo 5' caja Kozak	65

Posteriormente, un gen VH 2-14 Hudi-# 2 se sintetizó mediante mutagénesis dirigida a sitio basado en el método PCR, usando el gen HuDI-2-14 VH#1 como molde, de acuerdo con procedimientos descritos a continuación (Higuchi, R. 1989. Using PCR to Engineer DNA. En PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. H. A. Erlich, ed. Stockton Press, New York, pp. 61-70).

Esta PCR se llevó a cabo a través de 3 etapas de las reacciones de PCR utilizando los cebadores como se muestra en la Tabla 6 anterior (JNJ115, SEC ID N° 60; JNJ118, SEC ID N° 63; JNJ119, SEC ID N° 64; y JNJ120, SEC ID N° 65) con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción. La relación de posición entre la secuencia del gen de Hudi-2-14 VH # 2 y los cebadores F y R mencionados anteriormente se muestra en la Figura 37B.

"amplificación del fragmento 5' de Hudi-VH 2-14 # 2" (primera etapa)

<<Composición de la solución de reacción>>

ADN molde (2,5 ng/μl):	1 μl
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 μl
dNTP 10 mM	1 μl
Polimerasa ThermalAce	1 μl
Cebador F JNJ120 (10 μM):	1 μl
Cebador R JNJ118 (10 μM):	1 μl
Agua esterilizada	40 μl
Total:	50 μl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (20 s) → Hibridación: 55 °C (20 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (20 s)" se repitió 30 veces (un total de 30 ciclos).
"amplificación del fragmento 3' de Hudi-VH 2-14 # 2" (2ª etapa)

«Composición de la solución de reacción»

ADN molde (2,5 ng/μl):	1 μl
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 μl
dNTP 10 mM	1 μl
Polimerasa ThermalAce	1 μl
Cebador F JNJ115 (10 μM):	1 μl
Cebador R JNJ119 (10 μM):	1 μl
Agua esterilizada	40 μl
Total:	50 μl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (20 s) → Hibridación: 55 °C (20 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (20 s)" se repitió 30 veces (un total de 30 ciclos).
"Amplificación del gen HuDI-2-14 VH#2" (3ª etapa)

«Composición de la solución de reacción»

Producto de la PCR del fragmento en 5' de HuDI-2-14 VH#2 (0,5 ng/ml):	1 μl
Producto de la PCR del fragmento en 3' de HuDI-2-14 VH#2 (0,5 ng/ml):	1 μl
10 x tampón de PCR ThermalAce:	5 μl
dNTP 10 mM	1 μl
Polimerasa ThermalAce	1 μl
Cebador F JNJ120 (10 μM):	1 μl
Cebador R JNJ115 (10 μM):	1 μl
Agua esterilizada	40 μl
Total:	50 μl

<<Condiciones de la reacción>>

Un ciclo que consiste en "desnaturalización / disociación por calor: 94 °C (20 s) → Hibridación: 55 °C (20 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (20 s)" se repitió 30 veces (un total de 30 ciclos).

Como se indicó anteriormente, el producto de amplificación (fragmento de amplificación) obtenido mediante cada PCR se purificó utilizando el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Valencia, CA). A continuación, la VH se digirió

con las enzimas de restricción SpeI y HindIII, mientras que la VL se digirió con NheI y EcoRI. Posteriormente, cada producto se insertó en el sitio de restricción correspondiente en un vector de expresión de células animales para la expresión de una forma IgG1 / κ humana, construyendo de ese modo cada vector de expresión de interés.

- 5 La Figura 25 es una vista esquemática que muestra los vectores de expresión contruidos (se insertaron pHuDI-2-14-1 (Hudi-2-14 VH # 1 y Hudi-2-14 VL) y pHuDI-2-14-2 (se insertaron Hudi-2 -14 VH # 2 y Hudi-2-14 VL)).

5. Construcción de la línea celular productora de DI-2-14 humanizado

- 10 Se produjo una línea celular animal que produce de forma estable Hudi-2-14-1 IgG1 / κ y Hudi-2-14-2 IgG1 / κ . Como se ha descrito anteriormente, cada uno de los vectores de expresión contruidos se introdujo en una línea celular de mieloma de ratón NS0 (Colección Europea de Cultivos de Células Animales, Salisbury, Wiltshire, Reino Unido) por electroporación (Bebbington et al, Bio / Technology, 10.: 169-175, 1992). Veinticuatro horas después de la transducción, se añadió a las células un medio selectivo (DMEM + 10 % FBS + suplemento de HT (Sigma), 0,25 mg / ml de xantina y ácido micofenólico μ g/ ml). Además, aproximadamente 10 días después, la producción de anticuerpos humanizados se confirmó por el siguiente método usando un sobrenadante de cultivo de las células en crecimiento.

- 20 Producción de las proteínas CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y 2-14-2 Hudi en el sobrenadante del cultivo antes mencionado de las células NS0 se midió por un método ELISA de tipo sándwich. Específicamente, una placa de 96 pocillos se recubrió con un anticuerpo IgG antihumano de cabra específico de la cadena Fc γ (SouthernBiotech, Birmingham, Ala) diluido con PBS a una concentración de 1 μ g / ml (4 °C, durante la noche). Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado (PBS + 0,05 % Tween 20) y luego se bloqueó con un tampón de bloqueo (PBS + 2 % de leche descremada + 0,05 % de Tween 20) (a temperatura ambiente durante 1 hora). Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado y se añadió un sobrenadante de cultivo diluido con un tampón de ELISA (PBS + 1 % de leche descremada + 0,025 % de Tween 20). Una proteína Hudi-2-14-1 purificada se utilizó como patrón. La mezcla anterior se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas y luego se lavó con un tampón de lavado. A continuación se añadió un anticuerpo de cadena κ anti-humano de cabra marcado con HRP (SouthernBiotech) diluido a 1.000 veces con tampón de ELISA como anticuerpo de detección, seguido de reacción durante 1 hora. El
- 30 resultante se lavó con un tampón de lavado y un sustrato ABTS (Bioworld) y luego se añadió a para el desarrollo de color. A continuación, se midió la absorbancia a 405 nm.

6. Purificación de las proteínas de anticuerpo CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2

- 35 La línea celular establecida NS0 que produce de forma estable cada uno de los anticuerpos CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2 se adaptó a un medio sin suero (hibridoma SFM, Invitrogen). A continuación, un sobrenadante de cultivo obtenido mediante el cultivo de las células en el medio sin suero se recuperó y luego cada anticuerpo se purificó por un método ordinario usando una columna de Proteína A (GE Healthcare Biosciences).
- 40 La figura 26 muestra un anticuerpo DI-2-14 de ratón y los anticuerpos purificados CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi 2-14-2, que se aplicaron a SDS-PAGE y después se tiñeron con CBB. En todos los casos se detectaron una cadena H de aproximadamente 50 kDa y una cadena L de aproximadamente 25 kDa en condiciones reducidas, por lo que se confirmó la producción de la proteína anticuerpo CHDI-2-14, la proteína anticuerpo Hudi-2-14-1 y la proteína anticuerpo Hudi-2-14-2.

- 45 7. Afinidad por el antígeno del anticuerpo DI-2-14 quimérico (CHDI-2-14) y anticuerpos DI-2-14 humanizados (Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2)

- 50 La afinidad de antígeno de la proteína purificada CHDI-2-14, la proteína Hudi-2-14-1 y la proteína Hudi-2-14-2 se analizó mediante un método de ELISA.

- El ELISA se llevó a cabo de la misma manera que se describe en el Ejemplo 1, utilizando una placa de ELISA sobre la cual se había sido inmovilizado la proteína hFA-1 recombinante purificada (0,5 a 1 μ g / ml). Específicamente, la placa de ELISA se lavó con un tampón de lavado 3 veces y después se bloqueó utilizando una solución de bloqueo a temperatura ambiente durante 1 hora (o a 4 °C durante la noche). Posteriormente, la placa se lavó con un tampón de lavado 2 veces y cada una de un anticuerpo DI-2-14 de ratón, un anticuerpo CHDI-2-14, un anticuerpo Hudi-2-14-1 y un anticuerpo pHuDI-2-14-2, en donde las series de dilución se produjeron utilizando un tampón de ELISA, se añadieron a la placa, de manera que se dejaron reaccionar (a 4 °C durante la noche). A continuación, el producto resultante se lavó con un tampón de lavado 3 veces y luego se dejó reaccionar con IgG anti-ratón marcada con HRP (concentración final: 1 μ g/ml) o IgG antihumana marcada con HRP (concentración final: 1 μ g/ml) (ambos productos fabricados por GE Healthcare Biosciences), que se habían diluido con una solución de bloqueo. Como resultado, las curvas de reacción de DI-2-14, CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi de ratón casi se superponían entre sí y la CE₅₀ fue menor que 10 ng / ml en todos los casos (Figura 27).

- 65 Por otra parte, la actividad de unión de cada anticuerpo a una proteína hDlk-1 expresada en la superficie de una célula viva se analizó mediante citometría de flujo utilizando células HEK293-hDlk-1 y SK-F1-N que expresaban

endógenamente hDlk-1 en la superficie celular de las mismas. Tal citometría de flujo se llevó a cabo dejando una suspensión de células (densidad celular: 5×10^6 células / ml) de las células (células HEK293-1 hDlk o células F1 SK-N) retiradas de la placa de cultivo por un tratamiento con tripsina para reaccionar con cada anticuerpo primario (un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón (clon DI-2-14), CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2 (0,5 g cada uno)) a 4 °C durante 30 minutos. Después, el producto de reacción se lavó con PBS, se después se dejó reaccionar con IgG anti-ratón marcada con PE o IgG anti-rata marcada con PE (0,5 µg de cada uno; ambos disponibles en BD Pharmingen) a 4 °C durante 30 minutos, seguido de análisis usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company).

Como resultado, como con los resultados de ELISA, todos de la CHDI-2-14, Hudi-2-14-1 y 2-14-2 Hudi exhibieron capacidad de unión al antígeno que era equivalente a la de DI-2-14 de ratón (Figuras 28A y 28B).

Posteriormente, la afinidad de antígeno (valores de Kd) de los anticuerpos Hudi-2-14-2 y Hudi-2-14-1 se calculó mediante un método de ELISA utilizando (Djavadi-Ohanian L. et al (1996), In Antibody Engineering, Capítulo 4, pp. 77-97. IRL Press, Oxford).

Específicamente, se añadió una proteína hFA-1 recombinante purificada (1 µg / ml) a una placa de cultivo de 96 pocillos (Corning) de modo que el antígeno se inmovilizó sobre la misma (a temperatura ambiente durante 1 hora). Posteriormente, la placa se lavó con PBS 3 veces y se añadió leche descremada al 2 % (solución de PBS) para el bloqueo (a temperatura ambiente durante 1 hora). El resultante se lavó con PBS 2 veces. A continuación, un complejo antígeno-anticuerpo obtenido previamente por la mezcla de una solución de antígeno (proteína hFA-1 purificada; 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 nM) con cada clon (0,5 nM) de anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 y luego equilibrando la mezcla se añadió a la placa de ELISA antes mencionada y después se hicieron reaccionar (a temperatura ambiente durante 1 hora). A continuación, el producto resultante se lavó con PBS 3 veces y luego se dejó reaccionar (a temperatura ambiente durante 1 hora) con IgG anti-ratón marcada con HRP (concentración final: 1 µg/ml) o IgG antihumana marcada con HRP (concentración final: 1 µg/ml) (ambos fabricados por GE Healthcare Biosciences), que se habían diluido con una solución de bloqueo. Como resultado, se encontró que los valores de Kd eran 4,02 nM (anticuerpo DI-2-14 de ratón), 3,4 nM (anticuerpo CHDI-2-14), 2,8 nM (anticuerpo Hudi-2-14-1) y 3,1 nM (anticuerpo Hudi-2-14-2).

Los resultados anteriores demostraron que el anticuerpo DI-2-14 quimérico de ratón-humano (ChDI-2-14) y los anticuerpos humanizados (HuDI-2-14-1 y HuDI-2-14-2) mantienen una afinidad por el antígeno casi equivalente a la del anticuerpo DI-2-14 de ratón, que el anticuerpo quimérico DI-2-14 producido y los anticuerpos humanizados DI-2-14 mantienen la fuerte actividad antitumoral in vivo del anticuerpo de ratón DI-2-14 y, por lo tanto, que el anticuerpo quimérico DI-2-14 y los anticuerpos humanizados pueden convertirse en anticuerpos terapéuticos, anticuerpos de diagnóstico, o anticuerpos detectives, que son eficaces para los cánceres que expresan hDlk-1 en la superficie celular de los mismos.

8. Medición de la citotoxicidad celular (dependiente de anticuerpo (ADCC) del anticuerpo DI-2-14 humanizado

<Método>

(1) Tratamiento con recubrimiento de colágeno de placas de 96 pocillos de fondo plano

100 µl de cada uno de Cellmatrix Tipo IC (Lote 060823; Biochemical Laboratory, Nitta Gelatin Inc.) diluido 10 veces con HCl 1 mM (formado por dilución 100 veces de HCl 1 N con PBS) se añadió a cada pocillo de una placa de 96 pocillos de fondo plano y luego se dejó a temperatura ambiente durante 30 minutos o más. Inmediatamente antes del cultivo, la superficie de cultivo se lavó ligeramente con PBS y después se utilizó.

(2) Separación de monocitos de sangre periférica humana

Se recolectó sangre usando heparina de la sangre venosa de un donante sano y después se diluyó 2 veces con PBS. A continuación, se superpuso sobre Lymphoprep (Daiichi Kagaku Co.), seguido de centrifugación (a temperatura ambiente a 750 rpm durante 5 minutos, y luego, a 2.000 rpm durante 20 minutos). Después de la terminación de la centrifugación, los monocitos (los monocitos de sangre periférica del sujeto sano) existentes en una fracción de la capa intermedia se recuperaron y luego se lavaron con PBS 3 veces. A continuación se preparó una suspensión de células en un medio DMEM que contenía FBS al 2 % y después las células se utilizaron como células efectoras.

(3) Actividad ADCC de del anticuerpo DI-2-14 humanizado (anticuerpo Hudi-2-14-2)

El día antes de la medición de la actividad de ADCC, las células SK-N-F1 (células diana) que expresaban endógenamente hDlk-1 en la superficie celular de las mismas se retiraron de la placa mediante tratamiento con tripsina y se suspendieron después un medio DMEM que contiene 2 % de FBS. Después de la terminación de la centrifugación (a 1.000 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente), se preparó una suspensión de células a partir del sedimento en el mismo medio anterior, a fin de dar lugar a una densidad celular de 2×10^5 células / ml. La

suspensión se dispersó después en una cantidad de 100 µl (2×10^4 células / pocillo) en una placa de 96 pocillos de fondo plano revestida con colágeno y después se cultivaron durante la noche en una incubadora de CO₂ (37 ° C, 5 % CO₂).

- 5 A continuación (al día siguiente), se intercambió el medio por uno fresco del mismo tipo y se añadieron monocitos de sangre periférica humana (células efectoras) en una relación células efectoras/ células diana de 20: 1 y 40: 1. Posteriormente, se añadió un anticuerpo DI-2-14 humanizado (anticuerpo Hudi-2-14-2; 0,01, 0,1, 0,3, 1 y 10 µg / ml) como un anticuerpo de prueba. Se añadió IgG de ratón (purificada a partir de suero de ratón utilizando una columna de proteína G; 10 µg / ml) como control negativo. El clon M1-290 del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón
- 10 (isotipo IgG2b; 10 µg / ml) se añadió como control positivo. Por lo tanto, se cultivaron durante 6 horas en un incubador de CO₂ (37 °C, 5 % CO₂).

- Después de terminar el cultivo, se usó el kit de detección de citotoxicidad (LDH) (Roche, n° cat. 11 644 793 001) para medir la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH), que se liberó desde el citoplasma de las células diana dañadas por las células efectoras al sobrenadante del cultivo, de acuerdo con los protocolos incluidos con el kit. Utilizando el resultado de la medición como indicador, se evaluó la actividad de ADCC.
- 15

<Resultados>

- 20 Las células SK-N-F1 que expresan endógenamente hDlk-1 en la superficie celular se utilizaron como células diana. Los monocitos de sangre periférica de un donante sano se utilizaron como células efectoras. Por tanto, se midió la actividad de la ADCC de cada anticuerpo tal como un anticuerpo Hudi-2-14-1 y un anticuerpo Hudi-2-14-2.

- 25 La actividad ADCC se midió mediante la medición de la actividad de la lactato deshidrogenasa (LDH) liberada desde el citoplasma de las células diana dañadas por las células efectoras en el sobrenadante del cultivo.

- Como se muestra en la Figura 39 y la siguiente Tabla 7, en ambos casos en los que la proporción de células efectoras / células diana fue 20: 1 (E/T = 20) y 40 :1 (E/T = 40), la citotoxicidad dependiente de la dosis de las células diana se observó debido a la adición de los anticuerpos Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2. A partir de estos resultados, se encontró que, como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos humanizados HuDI-2-14-1 and
- 30 HuDI-2-14-2 mantienen la afinidad por el antígeno casi equivalente a la del anticuerpo DI-2-14 de ratón y que estos anticuerpos humanizados también tienen una actividad citotóxica debido a una actividad ADCC. Los resultados demostraron que el anticuerpo Hudi-2-14-1 y el anticuerpo Hudi-2-14-2 mantienen una fuerte actividad antitumoral poseída por el anticuerpo de ratón DI-2-14 in vivo y que estos anticuerpos se convertirían en anticuerpos
- 35 terapéuticos eficaces (o anticuerpos de diagnóstico o de detección) contra cánceres que expresan hDlk-1 en la superficie celular de las mismas.

Tabla 7

		Efectores / diana (E / T) = 20									
IgG Mus	M1-290	DI-2-14	ChDI-2-14	HuDI-2-14-1 (µg/ml)		HuDI-2-14-2 (µg/ml)					
				0,01	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0
3,0±1,6	'22,7±4,0	1,4 ± 4,2	'32,0 ± 4,5	-0,7 ± 1,6	'7,7 ± 1,9	'28,1 ± 3,0	'38,9 ± 2,5	1,7 ± 0,9	'3,8 ± 4,4	'8,0 ± 1,4	'16,4 ± 1,6
		Efectores / diana (E / T) = 40									
IgG Mus	M1-290	DI,2,14	ChDI-2-14	HuDI-2-14-1 (µg/ml)		HuDI-2-14-2(µ/ml)					
				0,01	0,1	1,0	10,0	0,01	0,1	1,0	10,0
0,6±1,5	'11,7 ± 6,6-	3,2 ± 0,6'	32,9± 3,5	-5,5 ± 3,4	2,1 ± 2,3	'21,3 ± 1,6	'33,1 ± 2,1	-0,3 ± 2,6	'4,6 ± 3,6	'7,5 ± 0,7	13,1 ± 3,0
IgG Mus (IgG de ratón, el control negativo; 10 µg / ml). DI.2.14 (clon DI-2-14 (IgG1) del anticuerpo monoclonal anti-Dlk.1 humano de ratón1 anticuerpo; 10 µg / ml). M1-290 (control positivo; clon M1-290 (IgG2b) de anticuerpo monoclonal Dlk-1 antihumano de ratón; 10 µg / ml)											
El valor numérico indica una tasa citotóxica (%). * P <0,01, ** P <0,05 por la prueba t de Student (valor medio ± error estándar (N = 3))											

9. Actividad antitumoral in vivo de los anticuerpos anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2)

9-1. Actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tratamiento del neuroblastoma humano

5 <Método>

El neuroblastoma humano (células SK-N-F1; catálogo ATCC N° CRL2142) que expresaban endógenamente hDlk-1 en la superficie celular se eliminó mediante un tratamiento con tripsina y después se añadió a PBS para preparar una suspensión de células a una densidad de 6×10^7 células / ml). La suspensión se mezcló con una cantidad igual de Matrigel (BD Pharmingen) en hielo. Usando una jeringa de 26 G, se inyectaron por vía subcutánea 100 μ l (3×10^6 células) de la mezcla en el flanco derecho de cada ratón con inmunodeficiencia grave combinada (NOD-scid). Diez a catorce días después del trasplante de las células cancerosas, los ratones cuyo volumen tumoral creció hasta de 50 a 150 mm³ (aproximadamente 100 mm³ de media) se dividieron en varios grupos. El día donde los ratones se dividieron en grupos se definió como el primer día (Día 1) y se inició la administración de anticuerpos (control negativo: IgG de ratón; un clon DI-2-14 del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón; y un anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 humanizado Hudi-2-14-2). Estos anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal a intervalos de una vez cada 3 días (20 mg / kg de peso corporal). La actividad antitumoral se evaluó mediante la medición de un volumen de tumor de la misma manera que en el Ejemplo 1. Además, en el último día del experimento, el tumor se extirpó en la autopsia y entonces se evaluó midiendo el volumen del mismo, se llevó a cabo una prueba de diferencia significativa mediante una prueba t de Student y cuando el valor obtenido fue de $P < 0,05$, se determinó que era estadísticamente significativa.

Además, el volumen del tumor se calculó de la misma manera que en el Ejemplo 1, utilizando la siguiente expresión:

$$25 \quad \text{Volumen tumoral (mm}^3\text{)} = (\text{eje menor})^2 \times (\text{eje mayor}) \times (\pi/6)$$

<Resultados>

La actividad antitumoral in vivo del anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 humanizado (Hudi-2-14-2) se evaluó utilizando los modelos de xenoinjerto de tratamiento utilizando células de neuroblastoma humano SK-N-F1 que expresan de forma endógena hDlk-1 en superficie celular de las mismas. Como resultado, como se muestra en la Figura 40A, en ambos casos del grupo de administración del clon DI-2-14 (anticuerpo monoclonal de ratón anti-hDlk-1) (20 mg / kg de peso corporal; N = 8) y el grupo de administración del anticuerpo HuDI-2-14-2 (20 mg / kg de peso corporal; N = 8), desde el día siguiente al del inicio de la administración al día 23 (Día 23) donde se completó el experimento, el volumen del tumor en relación con los mismos días anteriores fue estadísticamente significativamente pequeño ($P < 0,01$ por la prueba t de Student), en comparación con el grupo control (grupo de administración de IgG de ratón; 20 mg / kg de peso corporal; N = 8).

El día 23 (día 23) después del inicio de la administración, el volumen del tumor se encontró que era de $209,87 \pm 11,52$ mm³ ($P < 0,01$ mediante la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14 (5 mg / kg de peso corporal) y se encontró que era de $220,59 \pm 16,10$ mm³ ($P < 0,01$ por la prueba t de Student) en el grupo de administración de HuDI-2-14-2 mientras que se encontró que era de $579,49 \pm 131,73$ mm³ en el grupo de control. Por lo tanto, se confirmó una fuerte actividad anti-tumor a partir de los dos anticuerpos anteriores.

El peso del tumor, que se escindió una vez completado el experimento, se encontró que era de $0,04 \pm 0,006$ (g) ($P < 0,01$ mediante la prueba t de Student) en el grupo de administración del clon DI-2-14 y se encontró que era de $0,037 \pm 0,007$ (g) ($P < 0,01$ por la prueba t de Student) en el grupo de administración de HuDI-2-14-2, mientras que se encontró que era de $0,17 \pm 0,04$ (g) (Figura 40B). Por lo tanto, tanto en términos de volumen del tumor como del peso del tumor, se confirmó que Hudi-2-14-2 tenía una fuerte actividad antitumoral, así como el clon DI-2-14.

50 9.2 Actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tratamiento de la línea celular de cáncer de hígado humano

<Método>

Usando células HepG2 que eran células de cáncer de hígado humano que expresaban endógenamente hDlk-1 en la superficie celular de las mismas (células de cáncer de hígado que expresan hDlk-1 endógeno; adquiridas en Human Science Research Resources Bank; JCRB1954), se evaluó la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2). 5×10^6 células HepG2 se trasplantaron en el tejido subcutáneo del flanco derecho de cada ratón NOD-SCID. Doce días después del trasplante, cuando el volumen medio del tumor alcanzó 100 mm³ o mayor, los ratones se dividieron en varios grupos por aleatorización. A continuación, se inició la administración de los anticuerpos y la medida del tamaño del tumor.

<Resultados>

Como se muestra en la Figura 41A, en los grupos de administración de los anticuerpos hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi) se exhibió una actividad antitumoral dependiente de la dosis en comparación con el grupo control (grupo de administración de IgG humana; 5 mg / kg). Al noveno día (Día 9) después del inicio de la administración, el volumen del tumor del grupo de control se encontró que era de $1,046 \pm 253,6 \text{ mm}^3$ (N = 7). Por otro lado, en los grupos de administración de Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2, el volumen del tumor se encontró que era $1219,9 \pm 463,9 \text{ mm}^3$ (N = 8) y $917,1 \pm 296,9 \text{ mm}^3$ (N = 8), respectivamente, cuando la dosis fue de 0,1 mg / kg y se encontró que era $841,7 \pm 256,3 \text{ mm}^3$ (N = 8) y $772,8 \pm 215,3 \text{ mm}^3$ (N = 8), respectivamente, cuando la dosis fue de 0,5 mg / kg. Por otra parte, se encontró que era $436,7 \pm 54,4 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 por la prueba t de Student) y $385,1 \pm 53,8 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 por la prueba t de Student), respectivamente, cuando la dosis era 5 mg / kg.

En términos del peso del tumor extirpado, así, el peso del tumor del grupo de control se encontró que era $0,22 \pm 0,11$ (g). Por otro lado, en los grupos de administración de Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2 se encontró que era $0,05 \pm 0,03$ (g) (P <0,01 por la prueba t de Student) y $0,04 \pm 0,03$ (g) (P <0,01 por la prueba t de Student), respectivamente, cuando la dosis fue de 5 mg / kg. Por lo tanto, la actividad antitumoral se confirmó a partir de los dos anticuerpos anteriores (Figura 41B).

Los resultados antes mencionados demostraron que los anticuerpos anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2) tienen una actividad antitumoral in vivo contra el cáncer de hígado.

9.3 Actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tratamiento de la línea celular de cáncer de colon humano

<Método>

Usando las células SW480-hDlk-1 formadas permitiendo la expresión de hDlk-1 en la línea celular de cáncer de colon SW480 (células de cáncer de colon que expresaban hDlk-1), se evaluó la actividad antitumoral de los anticuerpos anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y Hudi-2-14-2). Las células SW480-hDlk-1 se produjeron mediante el mismo método que el descrito en el Ejemplo 1-1. 5×10^6 células SW480-hDlk-1 se transplantaron en el tejido subcutáneo del flanco derecho de cada ratón NOD-SCID. Siete días después del trasplante, cuando el volumen medio del tumor alcanzó 100 mm^3 o mayor, los ratones se dividieron en varios grupos por aleatorización. A continuación, se inició la administración de los anticuerpos y la medida del tamaño del tumor.

<Resultados>

Como se muestra en la Figura 42A, en los grupos de administración de los anticuerpos hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi), el crecimiento del tumor se suprimió considerablemente en comparación con el del grupo control (grupo de administración de IgG humana; 5 mg / kg). El día 28 (Día 28) después del inicio de la administración, el volumen del tumor del grupo de control se encontró que era de $565,4 \pm 102,1 \text{ mm}^3$ (N = 8). Por otro lado, en los grupos de administración de Hudi-2-14-1 y 2-14-2-Hudi, el volumen del tumor se encontró que era $309,6 \pm 39,9 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 por la prueba t de Student) y $326,5 \pm 36,7 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 mediante la prueba t de Student), respectivamente, cuando la dosis fue de 0,5 mg / kg y se encontró que era $252,9 \pm 41,8 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 mediante la prueba t de Student) y $235,1 \pm 26,7 \text{ mm}^3$ (N = 8; P <0,01 mediante la prueba t de Student), respectivamente, cuando la dosis fue de 5 mg / kg.

En términos del peso del tumor extirpado, así, el peso del tumor del grupo de control se encontró que era $0,10 \pm 0,03$ (g). Por otro lado, en los grupos de administración de Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2 se encontró que era $0,05 \pm 0,01$ (g) y $0,02 \pm 0,007$ (g) (P <0,01 por la prueba t de Student), respectivamente, cuando la dosis fue de 5 mg / kg. Por lo tanto, la actividad antitumoral se confirmó a partir de los dos anticuerpos anteriores (Figura 42B).

Los resultados antes mencionados demostraron que los anticuerpos anti-hDlk-1 humanizados (Hudi-2-14-1 y HuDI-2-14-2) tienen una actividad antitumoral in vivo contra el cáncer de colon.

9.4 Actividad antitumoral en modelos de xenoinjerto de tratamiento de la línea celular de cáncer de pulmón microcítico humano

<Método>

Usando células Lu135 que eran células de cáncer de pulmón microcítico que expresaban endógenamente hDlk-1 en la superficie celular de las mismas (células de cáncer de pulmón microcítico que expresan hDlk-1 endógeno; adquiridas en Human Science Research Resources Bank; JCRB0170), se evaluó la actividad antitumoral del anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado (Hudi-2-14-2). 3×10^6 células Lu135 se transplantaron en el tejido subcutáneo del flanco derecho de cada ratón NOD-SCID. Siete días después del trasplante, cuando el volumen medio del tumor alcanzó 100 mm^3 o mayor, los ratones se dividieron en varios grupos por aleatorización. A continuación, se inició la administración de los anticuerpos y la medida del tamaño del tumor.

<Resultados>

- Como se muestra en la Figura 43A, en el grupo de administración Hudi-2-14-2, no se exhibió una actividad antitumoral significativa en comparación con el grupo de control (grupo de administración de IgG humana; 5 mg / kg). El día 19 (Día 19) después del inicio de la administración, el volumen del tumor del grupo de control se encontró que era de $606,8 \pm 185,4 \text{ mm}^3$ (N = 8). Por otro lado, el volumen del tumor del grupo de administración Hudi-2-14-2 (5 mg / kg) se encontró que era $346,2 \pm 149,4 \text{ mm}^3$ (N = 8; $P < 0,05$ por la prueba t de Student).

En términos del peso del tumor extirpado, así, el peso del tumor del grupo de control se encontró que era $0,43 \pm 0,18$ (g). Por otro lado, el peso del tumor del grupo de administración Hudi-2-14-2 (5 mg / kg) se encontró que era $0,24 \pm 0,14$ (g) ($P < 0,05$ por la prueba t de Student). Por lo tanto, la actividad anti-tumor del anticuerpo anterior se confirmó (Figura 43B).

Los resultados antes mencionados han demostrado que el anticuerpo anti-hDlk-1 humanizado (HuDI-2-14-2) tiene una actividad antitumoral in vivo contra el cáncer de pulmón microcítico.

10. Expresión de hDlk-1 en las superficies celulares de las líneas celulares de cáncer de hígado humano, cáncer de mama y de leucemia (FACS).

Con el fin de examinar la expresión de hDlk-1 en las células cancerosas humanas más en detalle, el análisis por citometría de flujo utilizando un anticuerpo anti-hDlk-1 se realizó en las líneas celulares de cáncer de hígado (7 líneas celulares), líneas celulares de cáncer de mama (10 líneas celulares) y líneas celulares de leucemia mielocítica aguda (LMA(7 líneas celulares).

Las líneas celulares utilizadas que se enumeran a continuación se adquirieron en Japanese Health Sciences Foundation (Health Science Research Resources Bank), ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo), ECACC (Colección Europea de Cultivos Celulares) and DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares).

HL-60(ATCC), NB-4 (DSMZ), MV-4-11 (ATCC), KG-1 (ATCC), KG-1a (ATCC), TF-1 (ATCC), CMK-11-5 (Japanese Health Sciences Foundation), HepG2 (Japanese Health Sciences Foundation), C3A/HepG2 (ATCC), Huh-7 (Japanese Health Sciences Foundation), OCU-1 (Japanese Health Sciences Foundation), HLE (Japanese Health Sciences Foundation), HLF (Human Science Promotion Corporation), SK-HEP-1 (ATCC), HCC1143 (ATCC), JIMT-1 (DSMZ), ZR-75-1 (ATCC), MDA-MB-415 (ATCC), BT549 (ATCC), BT-474 (ATCC), MDA-MB-231 (ATCC), DU4475 (ATCC), T47D (ATCC) y MDA-MB-468 (ATCC).

En el caso de las líneas celulares de cáncer de hígado, la expresión de hDlk-1 en la superficie celular se confirmó en todos los utilizados 7 tipos de líneas celulares (Figura 29). En el caso de las líneas celulares de cáncer de mama, entre los utilizados 10 tipos de líneas celulares, la fuerte expresión de hDlk-1 se confirmó en las células HCC1143 y las células JIMT-1 (Figura 30) e incluso en los 8 tipos de células restantes líneas, la expresión de hDlk-1 se confirmó en la superficie celular, aunque el nivel de expresión fue baja (Figura 30). En el caso de las líneas de células de LMA, entre los utilizados 7 tipos de líneas celulares, la expresión de hDlk-1 en la superficie celular se confirmó en 4 tipos de líneas celulares tales como las células CMK-11-5, las células TF-1, las células MV-4-11 y las células NB-4 (Figura 31).

[Ejemplo 3]

Efecto inhibidor de la angiogénesis del anticuerpo DI-2-14 (anticuerpo monoclonal anti-hDlk-1 de ratón, clon DI-2-14) in vivo

<Método>

(1) Inmunohistotinción

Utilizando ratones portadores de cáncer de células Huh-7-hDlk-1, los tejidos cancerosos se extirparon de cada uno de un grupo de administración de IgG de ratón (un grupo de control: 2 ratones) y un grupo de administración de DI-2-14 (4 ratones). Los tejidos de cáncer fueron incorporados en un compuesto OCT (Tissue-Tek) y se preparó una sección congelada fresca ($7\mu\text{m}$). La sección se fijó a temperatura ambiente con 2,5 % de glutaraldehído / PBS durante 15 minutos y después con 0,5 % Triton X-100 / PBS durante 3 minutos. A continuación se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 5 minutos 3 veces. Posteriormente, la sección resultante se trató a temperatura ambiente durante 5 minutos con una solución producida por la adición de una solución de peróxido de hidrógeno a metanol a una concentración final de 0,3 %, a fin de eliminar la actividad de peroxidasa endógena. Después de eso, el portaobjetos se lavó con PBS, 0,1 % de Tween / PBS y 0,02 % de Tween / PBS en este orden, a temperatura ambiente durante 5 minutos para cada solución de lavado. De acuerdo a los protocolos de MOM La inmunodetección Kit TM (VECTOR), una operación de bloqueo se llevó a cabo utilizando MOM TM Ig de ratón Reactivo bloqueante, para bloquear los sitios de unión no específicos en los tejidos. A continuación, el portaobjetos

se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos 2 veces. A continuación, se hizo reaccionar con MOM[™] diluyente a temperatura ambiente durante 5 minutos. Desde recipiente de tumor en los-1-Huh-7 hDlk células vasculares formadas de células derivadas de tumor se deriva de ratón endoteliales, un anticuerpo anti-ratón de Flk-1 / VEGF-R2 (concentración final: 2 µg/ml) diluido con MOM[™] Ig de ratón Reactivo bloqueador se hizo reaccionar con él a temperatura ambiente durante 30 minutos y luego el producto de reacción se lavó con PBS a temperatura ambiente durante 2 minutos 2 veces. Posteriormente, un anticuerpo IgG anti-rata biotinilada diluido 100 veces con MOM[™] Diluyente se dejó reaccionar con la corredera a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de que el producto de reacción se lavó con PBS durante 2 minutos 2 veces, inmunohistotinción se llevó a cabo según el método inmunohistotinción como se describe en 11 anteriormente.

(2) RT-PCR

El término "RT-PCR" se utiliza en el presente ejemplo en el sentido de una reacción donde la síntesis de ADNc a partir del ARN extraído y PCR utilizando el ADNc como plantilla se llevó a cabo, por separado.

Utilizando ratones portadores de cáncer de células Huh-7-hDlk-1, los tejidos cancerosos se extirparon de cada uno de un grupo de administración de IgG de ratón (un grupo de control: 7 ratones) y un grupo de administración de DI-2-14 (7 ratones). Después, se extrajo el ARN de los tejidos de cáncer, utilizando un reactivo Trizol (Invitrogen). Posteriormente, utilizando el kit de síntesis de ADNc de primera hebra (GE Healthcare Biosciences), ADNc de primera hebra se sintetizó de acuerdo con los protocolos incluidos con el kit.

Utilizando el ADNc de primera hebra sintetizada como una plantilla, la expresión de un gen de ratón Flk-1 / VEGF-R2 (GenBank No. de acceso X70842), utilizado como un tumor vascular marcador de células endoteliales en los tejidos de cáncer de extirpados de cada uno de la administración de IgG de ratón grupo (el grupo de control: 7 ratones) y el grupo de administración de DI-2-14 (7 ratones) se analizó por el método PCR.

Los siguientes cebadores de PCR se utilizaron (producto de amplificación de PCR: 336 pb).

Cebador F: 5'-ctt-tac-tct-ccc-cag-tta-ca-3' (SEC ID N° 18)

Cebador R: 5'-ctt-tct-att-gtc-aag-gtg-ct-3' (SEC ID N° 19)

Usando los cebadores anteriormente mencionados, se llevó a cabo la PCR con la siguiente composición de una solución de reacción en las siguientes condiciones de reacción.

<<Composición de la solución de reacción>>

ADNc molde:	1 µl
10 x tampón de PCR:	5 µl
dNTP 2,5 mM	4 µl
ADN polimerasa Taq	0,5 µl
Cebador F (10 µM)	1 µl
Cebador R (10 µM)	1 µl
Agua esterilizada	37,5 µl
Total:	50 µl

<<Condiciones de la reacción>>

Después de realizar la desnaturalización a 95 °C (3 minutos), un ciclo que consiste en "desnaturalización por calor / disociación: 95°C (60 s) → Hibridación: 55 °C (60 s) → Síntesis/elongación: 72 °C (60 s)" se repitió 35 veces (un total de 35 ciclos).

Como control interno se usó GAPDH (GAPDH humano: NM_002046; GAPDH de ratón: NM_008084, NM_001001303, XM_001003314, XM_988853, XM_990238). Como cebadores de PCR utilizados en la amplificación de GAPDH, los siguientes se utilizaron cebadores (producto de amplificación de PCR: 452 pb). Estos cebadores permiten la amplificación en ambos casos de la utilización de cualquiera de GAPDH humano o GAPDH de ratón como una plantilla.

Cebador F: 5'-acc-aca-gtc-cat-gcc-atc-ac-3' (SEC ID N° 20)

Cebador R: 5'-tcc-acc-acc-ctg-ftg-ctg-ta-3' (SEC ID N° 21)

La amplificación de GAPDH se llevó a cabo en la misma condición de la PCR descrita anteriormente Flk-1 / VEGFR-2.

Con el fin de cuantificar los productos de PCR, los productos se separaron por primera vez por el 1,2 % electroforesis en gel de agarosa y luego se tiñeron con bromuro de etidio. A partir de entonces, la imagen electroforética obtenida fue capturado por un escáner, el producto de PCR se cuantifica luego con NIH Image y un gráfico fue entonces producto basado en la relación de Flk-1 / GAPDH.

<Resultados>

Como se muestra en la Figura 32, el número de células endoteliales vasculares del tumor, cuyo núcleo fue confirmada por tinción nuclear con hematoxilina en 8 a 13 campos visuales (una lente de objetivo de 200 veces) de cada uno de un grupo de administración de IgG (20 mg / kg de peso corporal) (2 ratones) y un grupo DI-2-14 administración (20 mg / kg de peso corporal) (4 ratones), y que fueron positivos para Flk-1 / VEGF-R2, se contó (el grupo de administración de IgG: total de 25 de campos visuales, el grupo de administración de DI-2-14: total de 35 campos visuales) y el número de células vasculares del tumor por campo visual se contó. Como resultado, el número de tales células se encontró que era $112,0 \pm 63,6$ (Flk-1 el número de células positivas / campo visual) del grupo de administración IgG, mientras que se encontró que el número de tales células para ser $36,3 \pm 2,2$ (Flk-1 - número de células positivas / campo visual) en el grupo de administración de DI-2-14. Por lo tanto, el número de células vasculares del tumor fue significativamente pequeña ($P < 0,01$) y por lo tanto se demostró que la angiogénesis tumoral fue inhibido por la administración de DI-2-14.

Por otra parte, en otro experimento, Huh-7-hDlk-1 células fueron también utilizados y expresión de un gen de Flk-1 / VEGF-R2 que actúa como un gen marcador específico para las células endoteliales vasculares tumorales en el tumor formado a partir de ratones portadores de cáncer cada uno de un grupo de administración de IgG (20 mg / kg de peso corporal, $N = 7$) y un grupo de administración de DI-2-14 (20 mg / kg de peso corporal, $N = 7$) ese analizaron semicuantitativamente mediante RT-PCR. Como resultado, como se muestra en la Figura 33, la expresión del gen Flk-1 / VEGF-R2 se redujo en el tumor del grupo de administración de DI-2-14. Este resultado demuestra que la angiogénesis tumoral se inhibió mediante la administración de DI-2-14.

<Consideración>

Se ha sabido que la angiogénesis tumoral es esencial para la formación de cáncer. Como un anticuerpo terapéutico cáncer que actúa principalmente para inhibir tales angiogénesis tumoral, un anticuerpo anti-VEGF (Avastin) ha sido conocido. Hasta la fecha, no se ha proporcionado información sobre la angiogénesis y la actividad inhibidora de la angiogénesis de hDlk-1 y un anticuerpo anti-hDlk-1. Además, con respecto a las funciones de hDlk-1, se han reportado el control de la diferenciación de las células adiposas y la aceleración del crecimiento de células de glioma o células de leucemia mediante la introducción estable del gen hDlk-1. Sin embargo, ha sido imposible de predecir, basándose en la información anterior, el hecho de que un-hDlk-1 anticuerpo anti (DI-2-14) tiene tumor actividad inhibidora de la angiogénesis. El presente ejemplo mostró al menos un mecanismo de acción de la actividad antitumoral in vivo del anticuerpo DI-2-14.

Aplicabilidad industrial

De acuerdo con la presente invención se pueden proporcionar anticuerpos anti-hDlk-1 que tienen actividad antitumoral, específicamente anticuerpos monoclonales anti-hDlk-1 que tienen actividad antitumoral in vivo y, particularmente, los anticuerpos mencionados anteriormente, que es un anticuerpos humanizados. Además, la presente invención puede proporcionar hibridomas que producen los anticuerpos mencionados anteriormente, un complejo de los anticuerpos antes mencionados y diversos tipos de agentes, una composición farmacéutica para el diagnóstico o el tratamiento de tumor, un método para detectar tumor y un kit para detectar o diagnosticar tumor.

TEXTO LIBRE DEL LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N° 3 a 21	ADN sintéticos
SEC ID N° 26	ADN recombinante
SEC ID N° 27	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEC ID N° 28	ADN recombinante
SEC ID N° 29	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEC ID N° 36 to 65	ADN sintéticos
SEC ID N° 67	Proteína recombinante
SEC ID N° 68	Proteína recombinante
SEC ID N° 71	Proteína recombinante
SEC ID N° 73	ADN recombinante
SEC ID N° 74	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEC ID N° 75	ADN recombinante
SEC ID N° 76	Construcción sintética (proteína recombinante)
SEC ID N° 77	ADN recombinante
SEC ID N° 78	Construcción sintética (proteína recombinante)

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> LivTech, Inc.
 5 <120> Anticuerpo anti-hDlk-1
 <130> PCT09-0001
 <150> US 61/069.834
 10 <151> 17-03-2008
 <160> 84
 <170> PatentIn versión 3.4
 15 <210> 1
 <211> 1532
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 20 <220>
 <221> CDS
 <222> (154) (1305)
 25 <400> 1

```

gagagcgcag cgcgcagccc ggtgcagccc tggttttccc ctgcctgcgc gccgcgccc      60

cctttcgcgt ccgcaaccag aagcccagtg cggcgccagg agccggaccc gcgcccgcac      120

cgctcccggg accgcgaccc cggccgcccc gag atg acc gcg acc gaa gcc ctc      174
                        Met Thr Ala Thr Glu Ala Leu
                        1                5

ctg cgc gtc ctc ttg ctc ctg ctg gct ttc ggc cac agc acc tat ggg      222
Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Ala Phe Gly His Ser Thr Tyr Gly
                10                15                20

gct gaa tgc ttc ccg gcc tgc aac ccc caa aat gga ttc tgc gag gat      270
Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro Gln Asn Gly Phe Cys Glu Asp
                25                30                35

gac aat gtt tgc agg tgc cag cct ggc tgg cag ggt ccc ott tgt gac      318
Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly Trp Gln Gly Pro Leu Cys Asp
40                45                50                55

cag tgc gtg acc tct ccc ggc tgc ctt cac gga ctc tgt gga gaa ccc      366
Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu His Gly Leu Cys Gly Glu Pro
                60                65                70
    
```

ggg cag tgc att tgc acc gac ggc tgg gac ggg gag ctc tgt gat aga	414
Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp Asp Gly Glu Leu Cys Asp Arg	
75 80 85	
gat gtt cgg gcc tgc tcc tcg gcc ccc tgt gcc aac aac ggg acc tgc	462
Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro Cys Ala Asn Asn Gly Thr Cys	
90 95 100	
gtg agc ctg gac gat ggc ctc tat gaa tgc tcc tgt gcc ccc ggg tac	510
Val Ser Leu Asp Asp Gly Leu Tyr Glu Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr	
105 110 115	
tgc gga aag gac tgc cag aaa aag gac ggg ccc tgt gtg atc aac ggc	558
Ser Gly Lys Asp Cys Gln Lys Lys Asp Gly Pro Cys Val Ile Asn Gly	
120 125 130 135	
tcc ccc tgc cag cac gga ggc acc tgc gtg gat gat gag ggc cgg gcc	606
Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys Val Asp Asp Glu Gly Arg Ala	
140 145 150	
tcc cat gcc tcc tgc ctg tgc ccc cct ggc ttc tca ggc aat ttc tgc	654
Ser His Ala Ser Cys Leu Cys Pro Pro Gly Phe Ser Gly Asn Phe Cys	
155 160 165	
gag atc gtg gcc aac agc tgc acc ccc aac cca tgc gag aac gac ggc	702
Glu Ile Val Ala Asn Ser Cys Thr Pro Asn Pro Cys Glu Asn Asp Gly	
170 175 180	
gtc tgc act gac att ggg ggc gac ttc cgc tgc cgg tgc cca gcc ggc	750
Val Cys Thr Asp Ile Gly Gly Asp Phe Arg Cys Arg Cys Pro Ala Gly	
185 190 195	
ttc atc gac aag acc tgc agc cgc ccg gtg acc aac tgc gcc agc agc	798
Phe Ile Asp Lys Thr Cys Ser Arg Pro Val Thr Asn Cys Ala Ser Ser	
200 205 210 215	
ccg tgc cag aac ggg ggc acc tgc ctg cag cac acc cag gtg agc tac	846
Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu Gln His Thr Gln Val Ser Tyr	
220 225 230	
gag tgt ctg tgc aag ccc gag ttc aca ggt ctc acc tgt gtc aag aag	894
Glu Cys Leu Cys Lys Pro Glu Phe Thr Gly Leu Thr Cys Val Lys Lys	
235 240 245	
cgc gcg ctg agc ccc cag cag gtc acc cgt ctg ccc agc ggc tat ggg	942
Arg Ala Leu Ser Pro Gln Gln Val Thr Arg Leu Pro Ser Gly Tyr Gly	
250 255 260	

ctg gcc tac cgc ctg acc cct ggg gtg cac gag ctg ccg gtg cag cag	990
Leu Ala Tyr Arg Leu Thr Pro Gly Val His Glu Leu Pro Val Gln Gln	
265 270 275	
ccg gag cac cgc atc ctg aag gtg tcc atg aaa gag ctc aac aag aaa	1038
Pro Glu His Arg Ile Leu Lys Val Ser Met Lys Glu Leu Asn Lys Lys	
280 285 290 295	
acc cct ctc ctc acc gag ggc cag gcc atc tgc ttc acc atc ctg ggc	1086
Thr Pro Leu Leu Thr Glu Gly Gln Ala Ile Cys Phe Thr Ile Leu Gly	
300 305 310	
gtg ctc acc agc ctg gtg gtg ctg ggc act gtg ggt atc gtc ttc ctc	1134
Val Leu Thr Ser Leu Val Val Leu Gly Thr Val Gly Ile Val Phe Leu	
315 320 325	
aac aag tgc gag acc tgg gtg tcc aac ctg cgc tac aac cac atg ctg	1182
Asn Lys Cys Glu Thr Trp Val Ser Asn Leu Arg Tyr Asn His Met Leu	
330 335 340	
cgg aag aag aag aac ctg ctg ctt cag tac aac agc ggg gag gac ctg	1230
Arg Lys Lys Lys Asn Leu Leu Gln Tyr Asn Ser Gly Glu Asp Leu	
345 350 355	
gcc gtc aac atc atc ttc ccc gag aag atc gac atg acc acc ttc agc	1278
Ala Val Asn Ile Ile Phe Pro Glu Lys Ile Asp Met Thr Thr Phe Ser	
360 365 370 375	
aag gag gcc ggc gac gag gag atc taa gcagcgttcc cacagccccc	1325
Lys Glu Ala Gly Asp Glu Glu Ile	
380	
tctagattct tggagtccg cagagcttac tatacgcggt ctgtcctaatt ctttgtgtg	1385
ttcgtatct ctttgttcaa atctggtgaa cgctacgctt acatatattg tctttgtgct	1445
gctgtgtgac aaacgcaatg caaaaacaat cctotttctc tctottaatg catgatacag	1505
aataataata agaatttcat ctttaaa	1532

<210> 2
 <211> 383
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

Met Thr Ala Thr Glu Ala Leu Leu Arg Val Leu Leu Leu Leu Leu Ala

1	5	10	15
Phe Gly His Ser Thr Tyr Gly Ala Glu Cys Phe Pro Ala Cys Asn Pro	20	25	30
Gln Asn Gly Phe Cys Glu Asp Asp Asn Val Cys Arg Cys Gln Pro Gly	35	40	45
Trp Gln Gly Pro Leu Cys Asp Gln Cys Val Thr Ser Pro Gly Cys Leu	50	55	60
His Gly Leu Cys Gly Glu Pro Gly Gln Cys Ile Cys Thr Asp Gly Trp	65	70	75
Asp Gly Glu Leu Cys Asp Arg Asp Val Arg Ala Cys Ser Ser Ala Pro	85	90	95
Cys Ala Asn Asn Gly Thr Cys Val Ser Leu Asp Asp Gly Leu Tyr Glu	100	105	110
Cys Ser Cys Ala Pro Gly Tyr Ser Gly Lys Asp Cys Gln Lys Lys Asp	115	120	125
Gly Pro Cys Val Ile Asn Gly Ser Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys	130	135	140
Val Asp Asp Glu Gly Arg Ala Ser His Ala Ser Cys Leu Cys Pro Pro	145	150	155
Gly Phe Ser Gly Asn Phe Cys Glu Ile Val Ala Asn Ser Cys Thr Pro	165	170	175
Asn Pro Cys Glu Asn Asp Gly Val Cys Thr Asp Ile Gly Gly Asp Phe	180	185	190
Arg Cys Arg Cys Pro Ala Gly Phe Ile Asp Lys Thr Cys Ser Arg Pro	195	200	205

Val Thr Asn Cys Ala Ser Ser Pro Cys Gln Asn Gly Gly Thr Cys Leu
210 215 220

Gln His Thr Gln Val Ser Tyr Glu Cys Leu Cys Lys Pro Glu Phe Thr
225 230 235 240

Gly Leu Thr Cys Val Lys Lys Arg Ala Leu Ser Pro Gln Gln Val Thr
245 250 255

Arg Leu Pro Ser Gly Tyr Gly Leu Ala Tyr Arg Leu Thr Pro Gly Val
260 265 270

His Glu Leu Pro Val Gln Gln Pro Glu His Arg Ile Leu Lys Val Ser
275 280 285

Met Lys Glu Leu Asn Lys Lys Thr Pro Leu Leu Thr Glu Gly Gln Ala
290 295 300

Ile Cys Phe Thr Ile Leu Gly Val Leu Thr Ser Leu Val Val Leu Gly
305 310 315 320

Thr Val Gly Ile Val Phe Leu Asn Lys Cys Glu Thr Trp Val Ser Asn
325 330 335

Leu Arg Tyr Asn His Met Leu Arg Lys Lys Lys Asn Leu Leu Gln
340 345 350

Tyr Asn Ser Gly Glu Asp Leu Ala Val Asn Ile Ile Phe Pro Glu Lys
355 360 365

Ile Asp Met Thr Thr Phe Ser Lys Glu Ala Gly Asp Glu Glu Ile
370 375 380

<210> 3
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN sintético

	<400> 3 cgctccgca accagaagcc c	21
5	<210> 4 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ADN sintético	
	<400> 4 ctcgaggtgc tccggctgct gcaccggc	28
15	<210> 5 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> ADN sintético	
25	<400> 5 gcggccggct gaatgcttc cggcc	25
30	<210> 6 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 6 tctagagagg ctgtggcca cgatctgc	29
40	<210> 7 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
45	<400> 7 gcggccggct gaatgcttc cggcc	25
50	<210> 8 <211> 28 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
55	<400> 8 tctagaccg tcttttct ggcagtcc	28
60	<210> 9 <211> 25 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> ADN sintético	

	<400> 9 gcggccggct gaatgcttc cggcc	25
5	<210> 10 <211> 26 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ADN sintético	
	<400> 10 tctagaggcc cgaacatctc tatcac	26
15	<210> 11 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> ADN sintético	
25	<400> 11 gcggccgcaa aaaggacggg ccctgtg	27
30	<210> 12 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 12 gcgtatagta agctctgcgg	20
40	<210> 13 <211> 29 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
45	<400> 13 caggcagcgg ccgcgagatc gtggccaac	29
50	<210> 14 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
55	<400> 14 gcgtatagta agctctgcgg	20
60	<210> 15 <211> 23 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> ADN sintético	

	<400> 15 cgactggagc acgaggacac tga	23
5	<210> 16 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> ADN sintético	
	<400> 16 gccagtggat agacagatgg	20
15	<210> 17 <211> 21 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> ADN sintético	
25	<400> 17 gatggataca gttggtgcag c	21
30	<210> 18 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 18 ctttactctc cccagttaca	20
40	<210> 19 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
45	<400> 19 ctttctattg tcaaggtgct	20
50	<210> 20 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
55	<400> 20 accacagtcc atgccatcac	20
60	<210> 21 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
65	<220> <223> ADN sintético	

<400> 21
tccaccaccc tgttctgta 20

5 <210> 22
<211> 411
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10 <220>
<221> CDS
<222> (1)..(411)

<400> 22

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 tot 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 tot ggc ttc aac att 144
Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

aga gac acc tat ata cac tgg gtg aag cag agg cct gag cag ggc ctg 192
Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

gag tgg att gga agg att gat cct ccg aat ggt aat ctt aaa tat gac 240
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn Leu 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 ttc agc agc ctg aca tot gag gac act gcc gtc 336
Thr Ala Tyr Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

tat tac tgt gca agg tot gat ggt tac tcc ttt gct tac tgg ggc caa 384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Gly Tyr Ser Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

ggg act ctg gtc act gtc tot gca gcc 411
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
130 135

<210> 23
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 23

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

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

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn Leu 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 Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
 100 105 110

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala
 130 135

10

<210> 24
 <211> 396
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (396)

20

<400> 24

atg agg tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc tgg atc cct	48
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro	
1 5 10 15	
gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag gct gca ccc tct gta cct	96
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro	
20 25 30	
gtc act cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct agt aag agt	144
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser	
35 40 45	
ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc ctg cag agg	192
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg	
50 55 60	
cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc aac ctt gcc	240
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala	
65 70 75 80	
tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga act gct ttc	288
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe	
85 90 95	
aca ctg aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt gtt tat tac	336
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr	
100 105 110	
tgt atg caa cat gta gaa tat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag	384
Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys	
115 120 125	
ttg gaa ata aaa	396
Leu Glu Ile Lys	
130	

<210> 25
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 25

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

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

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

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

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

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys
130

5 <210> 26
<211> 442
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (13)..(420)

15 <400> 26

actagtacca cc atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca gtc	51
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala Val	
1 5 10	
ggt aca ggg gtc aat tca gag gtt cag ctg cag cag tct ggg gca gag	99
Val Thr Gly Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu	
15 20 25	
ctt gtg aag cca ggg gcc tca gtc aag ttg tcc tgc aca gct tct ggc	147
Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly	
30 35 40 45	
ttc aac att aga gac acc tat ata cac tgg gtg aag cag agg cct gag	195
Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu	
50 55 60	
cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct cgg aat ggt aat ctt	243
Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn Leu	
65 70 75	
aaa tat gac cgg aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac aca	291
Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr	
80 85 90	
tcc tcc aac aca gcc tac ctg cag ttc agc agc ctg aca tct gag gac	339
Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp	
95 100 105	
act gcc gtc tat tac tgt gca agg tct gat ggt tac tcc ttt gct tac	387
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Gly Tyr Ser Phe Ala Tyr	
110 115 120 125	
tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tot gca ggtgagtcct aacttcaagc	440
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
130 135	
tt	442

5 <210> 27
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 27

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

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

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn Leu 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 Phe Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135

5 <210> 28
<211> 431
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (13) (420)

15 <400> 28

gotagcacca cc atg agg tgc cta got gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg ctc	51
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu	
1 5 10	
tgg atc cct gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag got gca ccc	99
Trp Ile Pro Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro	
15 20 25	
tct gta cct gtc act cct gga gag tca gta tcc atc tcc tgc agg tct	147
Ser Val Pro Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser	
30 35 40 45	
agt aag agt ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg ttc	195
Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe	
50 55 60	
ctg cag agg cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg tcc	243
Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser	
65 70 75	
aac ctt gcc tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca gga	291
Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
80 85 90	
act gct ttc aca ctg aga atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg ggt	339
Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly	
95 100 105	
gtt tat tac tgt atg caa cat gta gaa tat cca ttc acg ttc ggc tcg	387
Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser	
110 115 120 125	
ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgt aag tag act tttgcgaatt c	431
Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Lys Thr	
130 135	

5 <210> 29
 <211> 134
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 29

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15

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

Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60

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

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

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Lys
130

5 <210> 30
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

10 <400> 30

Asp Thr Tyr Ile His
1 5

15 <210> 31
<211> 17
<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 31

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

Gly

5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 32

Ser Asp Gly Tyr Ser Phe Ala Tyr

1

5

15

<210> 33

<211> 16

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 33

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

25

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

30

<400> 34

Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 35

<211> 9

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 35

Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

40

<210> 36

<211> 56

<212> ADN

45 <213> Artificial

	<220> <223> ADN sintético	
5	<400> 36 gggctagcac caccatgagg tgcctagctg agttcctggg gctgcttgctg ctctgg	56
10	<210> 37 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> ADN sintético	
20	<400> 37 ctgagtcatc acaatatccc caatggctcc agggatccag agcacaagca gccccca	56
25	<210> 38 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 38 gggatattgt gatgactcag tctccactct ctctgcctgt cactcctgga gagccg	56
40	<210> 39 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> ADN sintético	
50	<400> 39 caggagactc ttgctagacc tgcaggagat ggaggccggc tctccaggag tgacag	56
55	<210> 40 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> ADN sintético	
65	<400> 40 ctagcaagag tctcctgcat agtaatggca acacttactt gtattggttc ctgcag	56
	<210> 41 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
	<400> 41 ccgatatatc aggagctgag gagactggcc tggcttctgc aggaaccaat acaagt	56
	<210> 42 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	

	<220> <223> ADN sintético	
5	<400> 42 ctcagctcct gatataatcgg atgtccaacc ttgcctcagg agtcccagac aggttc	56
10	<210> 43 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> ADN sintético	
15	<400> 43 tttcagtgtg aaagcagttc ctgaccact gccactgaac ctgtctggga ctctg	56
20	<210> 44 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
25	<220> <223> ADN sintético	
25	<400> 44 gaactgctt cactgaaa atcagtagag tggaggctga ggatgtgggt gttat	56
30	<210> 45 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
35	<220> <223> ADN sintético	
40	<400> 45 gaacgtgaat ggatattcta catgttgcac acagtaataa acaccacacat cctcag	56
45	<210> 46 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> ADN sintético	
50	<400> 46 tagaatatcc attcagttc ggccaaggga caaagggtga aatcaaacgt gagtag	56
55	<210> 47 <211> 37 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> ADN sintético	
60	<400> 47 ggggaattct ttaaattcta ctcacgttg attcca	37
65	<210> 48 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	

	<220> <223> ADN sintético	
5	<400> 48 gggactagta ccacatgaaa tgcagctggg ttatcttctt cctgatggca gtgggt	56
10	<210> 49 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> ADN sintético	
20	<400> 49 agactgcacc agctgaacct gtgaattgac cctgtaacc actgcatca ggaaga	56
25	<210> 50 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 50 agggtcagct ggtgcagtct ggggcagagg tgaagaagcc agggctctca gtcaag	56
40	<210> 51 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> ADN sintético	
50	<400> 51 gtctctaattg ttgaagccag aagccttgca ggagacctg actgaggacc ctggct	56
55	<210> 52 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> ADN sintético	
65	<400> 52 ctggcttcaa cattagagac acctatatac actgggtgcg gcaggcccct ggacag	56
70	<210> 53 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	
75	<220> <223> ADN sintético	
80	<400> 53 accattcgga ggatcaatcc ttccaatcca ctccaggccc tgtccagggg cctgcc	56
85	<210> 54 <211> 56 <212> ADN <213> Artificial	

	<220>	
	<223> ADN sintético	
5	<400> 54 ttgatcctcc gaatggtaat cttaaatacg acccgaagtt ccagggaag gccact	56
	<210> 55	
	<211> 56	
10	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
15	<400> 55 catgtaggct gtgctcgtgg atgtgtctgc tgttatagtg gcctgccct ggaact	56
	<210> 56	
	<211> 56	
20	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> ADN sintético	
25	<400> 56 ccacgagcac agcctacatg gagttcagca gcctgagatc tgaggacact gccgtc	56
	<210> 57	
30	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
35	<223> ADN sintético	
	<400> 57 agcaaaggag taaccatcag acctgcaca gtaatagacg gcagtgctct cagatc	56
40	<210> 58	
	<211> 56	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
45	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 58 ctgatggta ctctttgct tactggggcc aagggaactct ggtcactgtc tcttca	56
50	<210> 59	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> ADN sintético	
	<400> 59 gggaagcttt acagcagact cacctgaaga gacagtgacc agag	44
	<210> 60	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Artificial	

	<220> <223> ADN sintético	
5	<400> 60 gggaagcttt acagcagact	20
10	<210> 61 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
15	<220> <223> ADN sintético	
20	<400> 61 gggctagcac caccatgagg	20
25	<210> 62 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> ADN sintético	
35	<400> 62 ggggaattct ttaaattcta	20
40	<210> 63 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> ADN sintético	
50	<400> 63 caggctgctc agctccatgt aggctgt	27
55	<210> 64 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
60	<220> <223> ADN sintético	
65	<400> 64 tacatggagc tgagcagcct gagatct	27
	<210> 65 <211> 27 <212> ADN <213> Artificial	
	<220> <223> ADN sintético	
	<400> 65 gggactagta ccaccatgaa atgcagc27	
	<210> 66 <211> 117 <212> PRT <213> <i>Mus musculus</i>	

<400> 66

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr
20 25 30

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

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ala
115

5 <210> 67
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> proteína recombinante

<400> 67

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

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

Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 68
<211> 117
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 68

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

<210> 69
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 69

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

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

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Asp Ile Leu Thr Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 70
<211> 112
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 70

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

Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> proteína recombinante

<400> 71

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 72
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 72

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Leu Gln Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 73
<211> 447
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (16)..(423)

<400> 73

gggactagta ccacc atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca 51
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala
1 5 10

gtg gtt aca ggg gtc aat tca cag gtt cag ctg gtg cag tct ggg gca 99
Val Val Thr Gly Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala

15	20	25	
gag gtg aag aag cca ggg tcc tca gtc aag gtc tcc tgc aag got tct			147
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser			
30	35	40	
ggc ttc aac att aga gac acc tat ata cac tgg gtg cgg cag gcc oct			195
Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro			
45	50	55	60
gga cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct ccg aat ggt aat			243
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn			
65	70	75	
ctt aaa tat gac ccg aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac			291
Leu Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp			
80	85	90	
aca tcc acg agc aca gcc tac atg gag ttc agc agc ctg aga tot gag			339
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Phe Ser Ser Leu Arg Ser Glu			
95	100	105	
gac act gcc gtc tat tac tgt gca agg tct gat ggt tac tcc ttt got			387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Gly Tyr Ser Phe Ala			
110	115	120	
tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct tca ggtgagtotg			433
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
125	130	135	
ctgtaaagct tccc			447

<210> 74
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 74

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

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

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

Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 75
<211> 447
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (16) (423)

<400> 75

gggactagta ccacc atg aaa tgc agc tgg gtt atc ttc ttc ctg atg gca 51
Met Lys Cys Ser Trp Val Ile Phe Phe Leu Met Ala
1 5 10

gtg gtt aca ggg gtc aat tca cag gtt cag ctg gtg cag tct ggg gca 99

Val Val Thr Gly Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala	
15 20 25	
gag gtg aag aag cca ggg tcc tca gtc aag gtc tcc tgc aag gct tct	147
Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser	
30 35 40	
ggc ttc aac att aga gac acc tat ata cac tgg gtg cgg cag gcc cct	195
Gly Phe Asn Ile Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
45 50 55 60	
gga cag ggc ctg gag tgg att gga agg att gat cct ccg aat ggt aat	243
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Pro Asn Gly Asn	
65 70 75	
ctt aaa tat gac ccg aag ttc cag ggc aag gcc act ata aca gca gac	291
Leu Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp	
80 85 90	
aca tcc acg agc aca gcc tac atg gag ctg agc agc ctg aga tct gag	339
Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu	
95 100 105	
gac act gcc gtc tat tac tgt gca agg tct gat ggt tac tcc ttt gct	387
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Asp Gly Tyr Ser Phe Ala	
110 115 120	
tac tgg ggc caa gga act ctg gtc act gtc tct tca ggtgagctg	433
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
125 130 135	
ctgtaaagct tccc	447

<210> 76
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 76

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

Val Asn Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys

20

25

30

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

Arg Asp Thr Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 77
<211> 436
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> ADN recombinante

<220>
<221> CDS
<222> (15)..(410)

<400> 77

gggctagcac cacc atg agg tgc cta gct gag ttc ctg ggg ctg ctt gtg 50
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val
1 5 10

ctc tgg atc cct gga gcc att ggg gat att gtg atg act cag tct cca 98
 Leu Trp Ile Pro Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
 15 20 25

ctc tct ctg cct gtc act cct gga gag cgg gcc tcc atc tcc tgc agg 146
 Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg
 30 35 40

tct agc aag agt ctc ctg cat agt aat ggc aac act tac ttg tat tgg 194
 Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp
 45 50 55 60

ttc ctg cag aag cca ggc cag tct cct cag ctc ctg ata tat cgg atg 242
 Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met
 65 70 75

tcc aac ctt gcc tca gga gtc cca gac agg ttc agt ggc agt ggg tca 290
 Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
 80 85 90

gga act gct ttc aca ctg aaa atc agt aga gtg gag gct gag gat gtg 338
 Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val
 95 100 105

ggt gtt tat tac tgt atg caa cat gta gaa tat cca ttc acg ttc ggc 386
 Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly
 110 115 120

caa ggg aca aag gtg gaa atc aaa cgtgagtaga atttaaagaa ttcccc 436
 Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 125 130

<210> 78
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Construcción sintética (proteína recombinante)

<400> 78

Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys
50 55 60

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

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

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Met Gln His Val Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
115 120 125

Val Glu Ile Lys
130

<210> 79
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 79

Ser Tyr Ala Ile Ser
1 5

<210> 80
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 80

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

Gly

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 81

 Gly Asp Ile Leu Thr Gly Leu Asn Trp Phe Asp Pro
 1 5 10

 10
 <210> 82
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <400> 82

 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

 20
 <210> 83
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 83

 Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser
 1 5

 30
 <210> 84
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 84

 Met Gln Ala Leu Gln Thr Pro Trp Thr
 1 5
 35

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo contra Dlk-1, humano, donde la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en las SEC ID N° 67 o 68 y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en la SEC ID N° 71.
2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, que es un anticuerpo humanizado.
3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que tiene actividad antitumoral in vivo.
4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 3, donde la actividad antitumoral es una actividad de inhibición de la angiogénesis tumoral.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el tumor es al menos de un tipo seleccionado del grupo que consiste en cáncer de colon humano, cáncer de mama humano, cáncer de hígado humano, cáncer de pulmón microcítico y neuroblastoma humano.
6. Un fragmento del anticuerpo contra Dlk-1 humano definido en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el fragmento comprende la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena H mostrada en las SEC ID N° 67 o 68 y la secuencia de aminoácidos de la región V de la cadena L mostrada en la SEC ID N° 71.
7. Un complejo anticuerpo – agente que comprende el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad de destrucción celular.
8. Un complejo fragmento de anticuerpo – agente que comprende el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 y un compuesto que tiene una actividad antitumoral y/o una actividad de destrucción celular.
9. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o el complejo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para su uso en el tratamiento de un tumor o en la inhibición de una angiogénesis tumoral.
10. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o el complejo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8 para su uso en el diagnóstico o detección in vivo de un tumor.
11. Un método in vitro para diagnosticar o detectar un tumor usando el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o el complejo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
12. El método de la reivindicación 11, que comprende: permitir que al menos un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o complejo reaccione con una muestra recolectada de un cuerpo vivo y detectar una o más señales del anticuerpo y/o fragmento de anticuerpo que ha reaccionado.
13. Un método para inhibir una angiogénesis tumoral in vitro que comprende tratar un tumor con el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o el complejo del mismo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.
14. Un kit para tratar, diagnosticar o detectar un tumor o la inhibición de una angiogénesis tumoral, que comprende al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, el fragmento de anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 y el complejo de acuerdo con la reivindicación 7 u 8.

Fig. 1

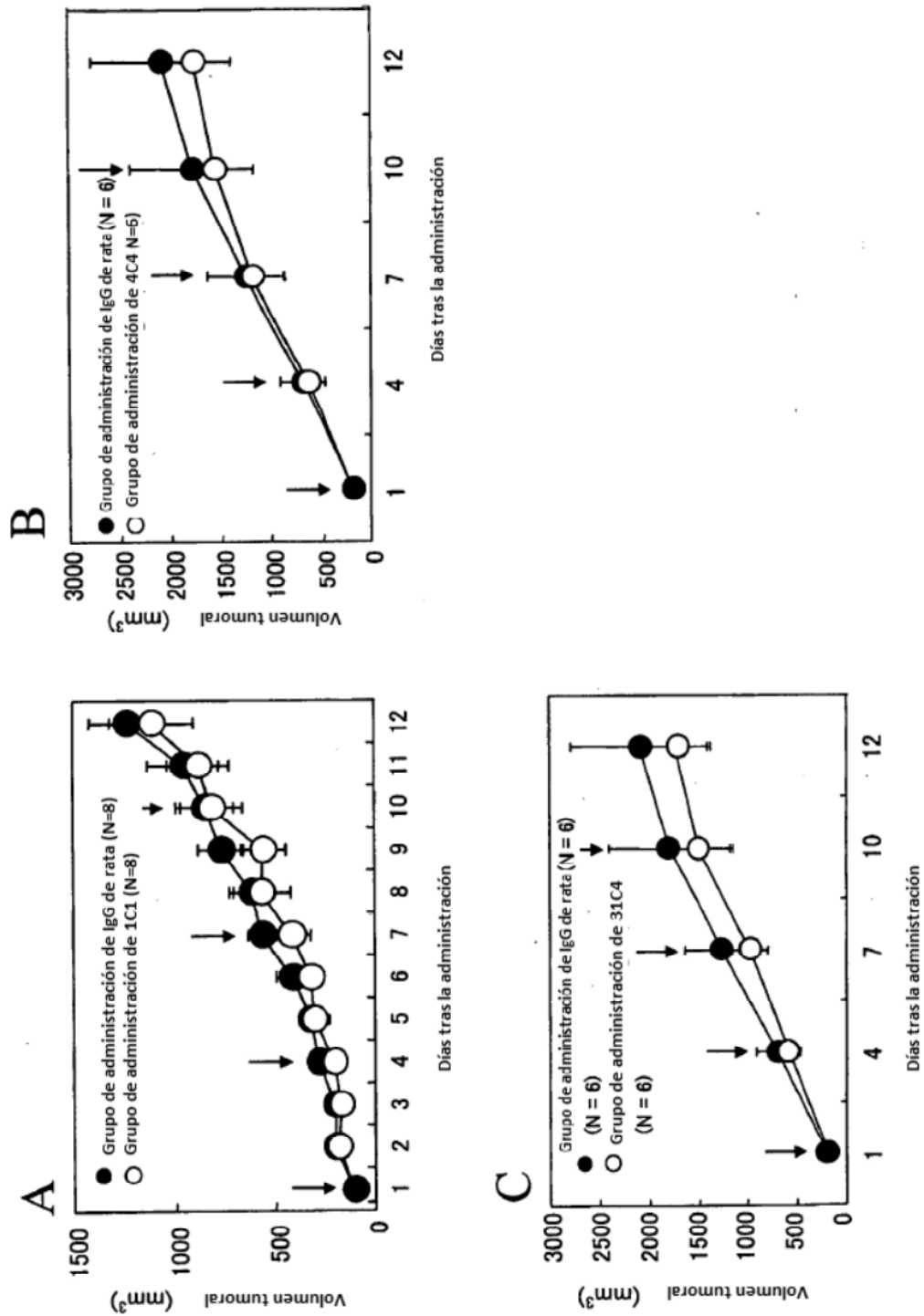


Fig. 2

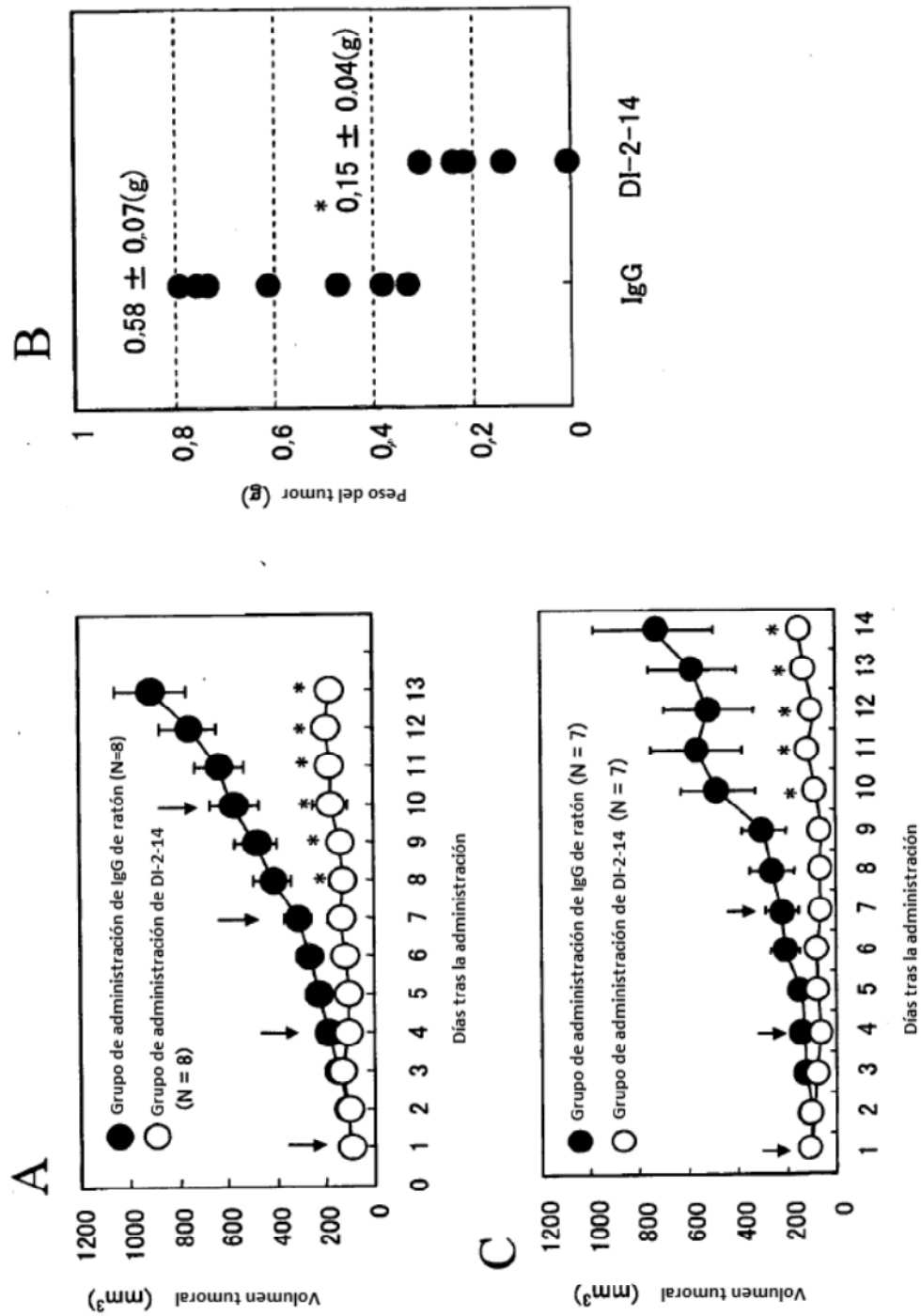


Fig. 3

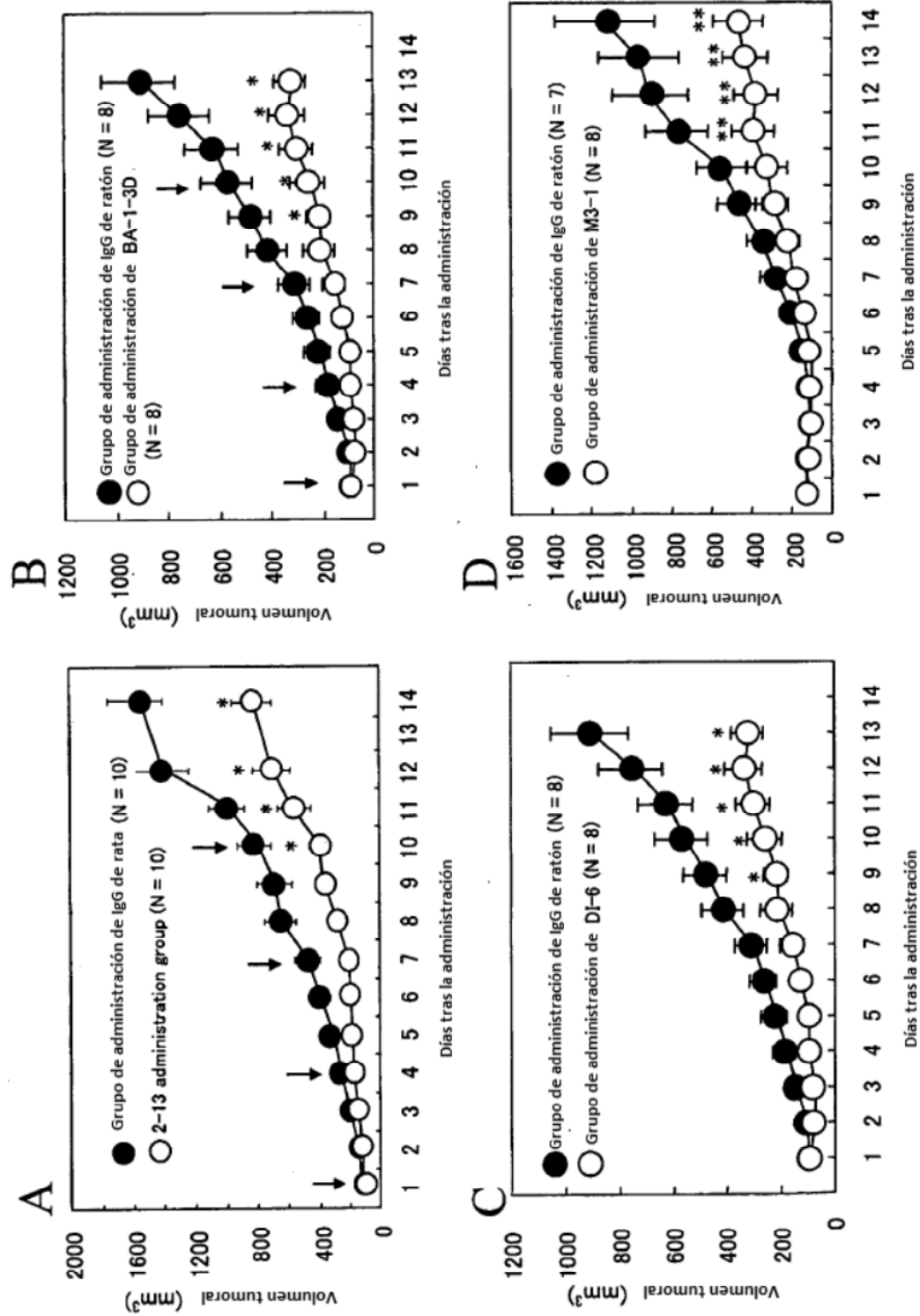


Fig. 4

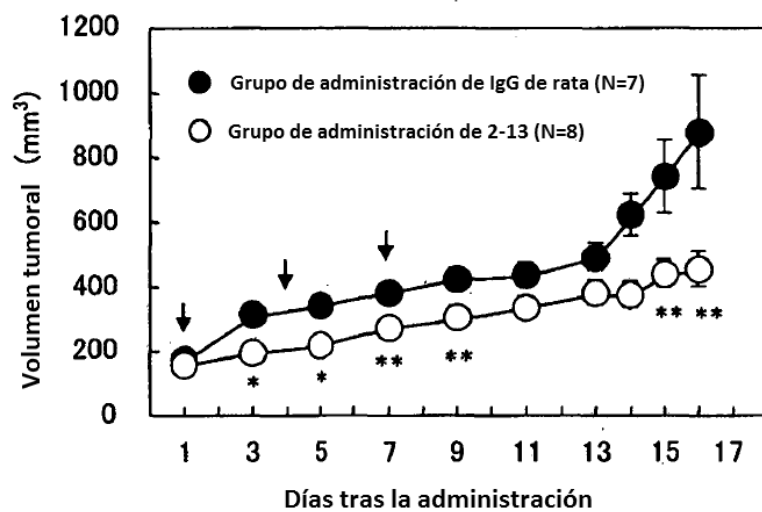


Fig. 5

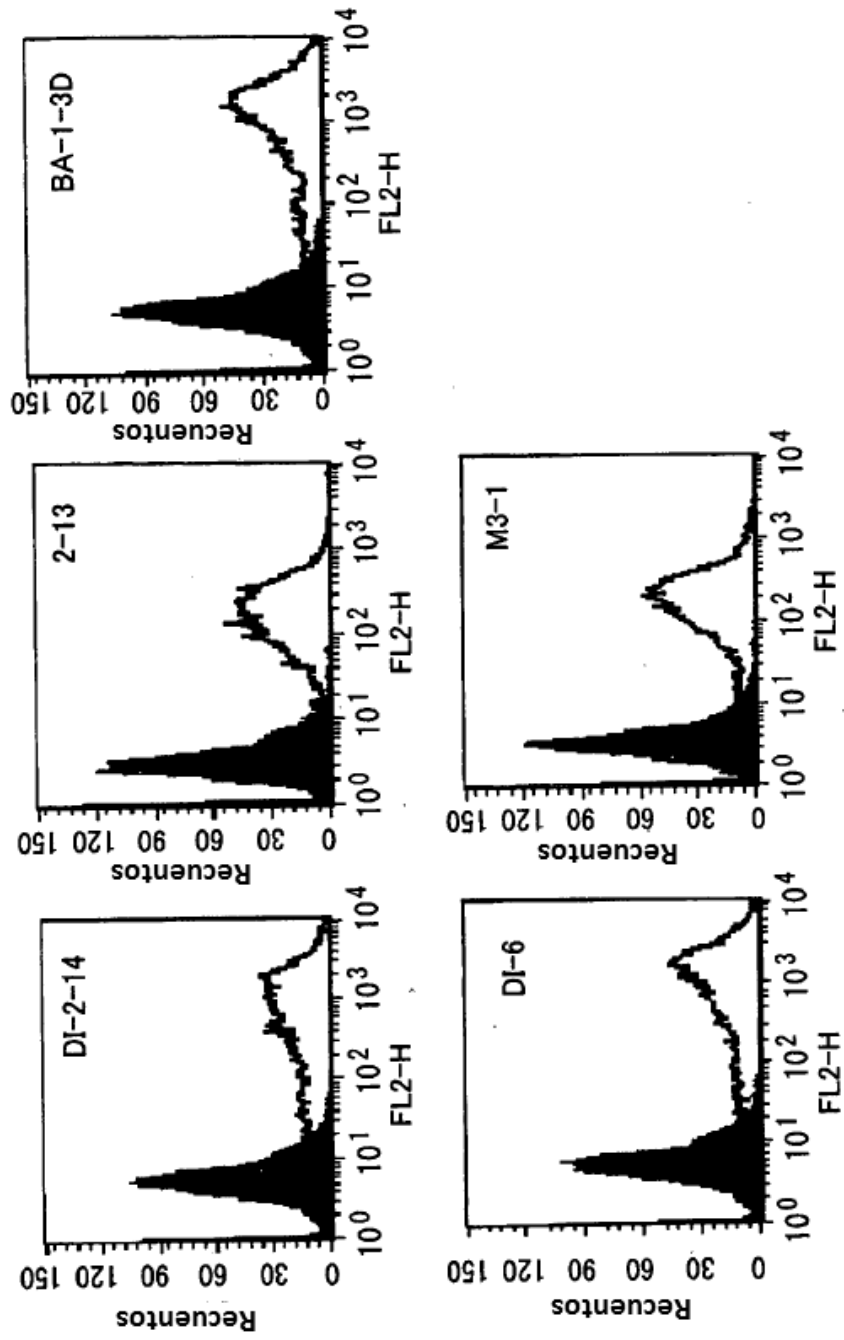


Fig. 6

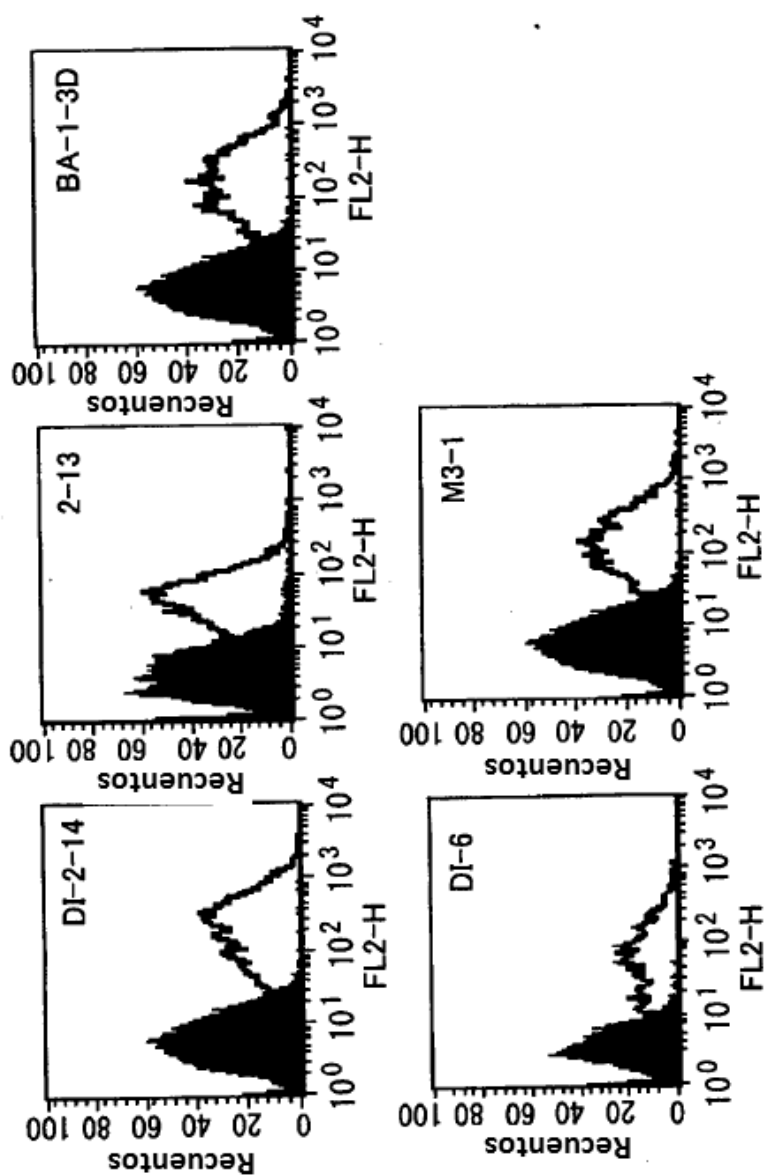


Fig. 7

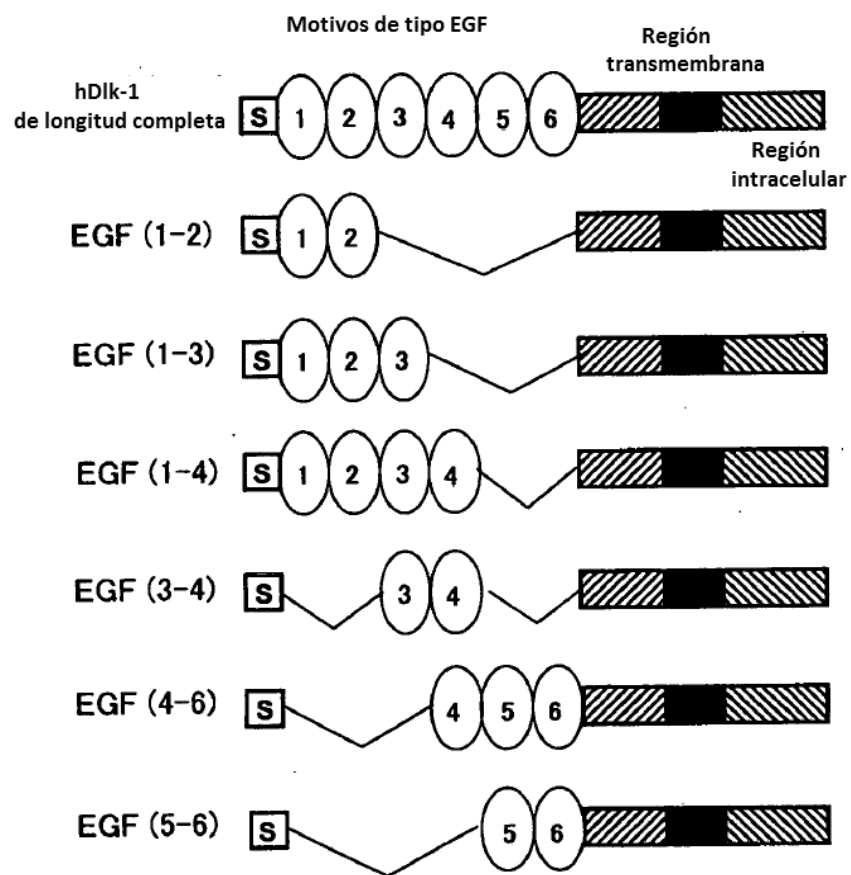


Fig. 8

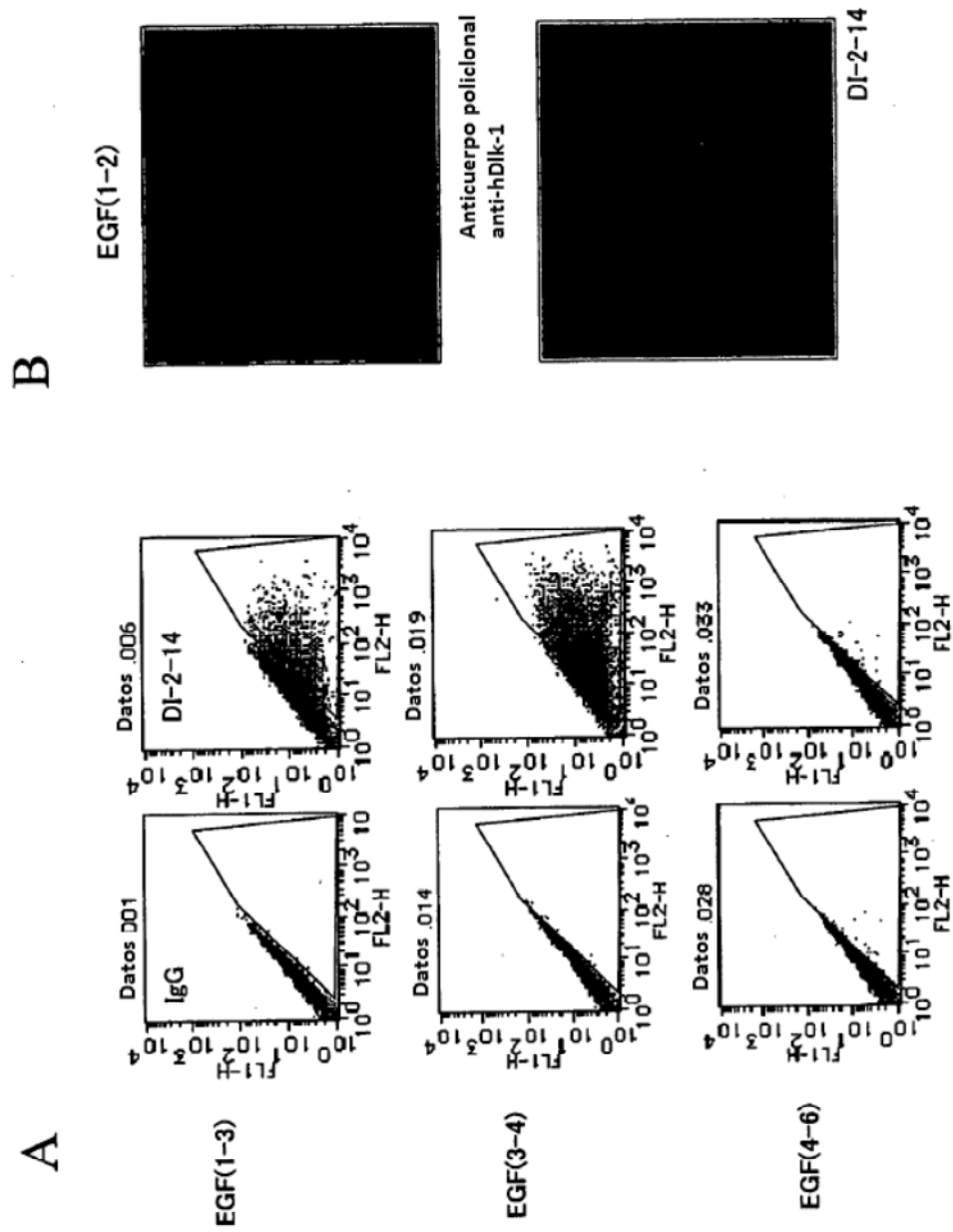


Fig. 9

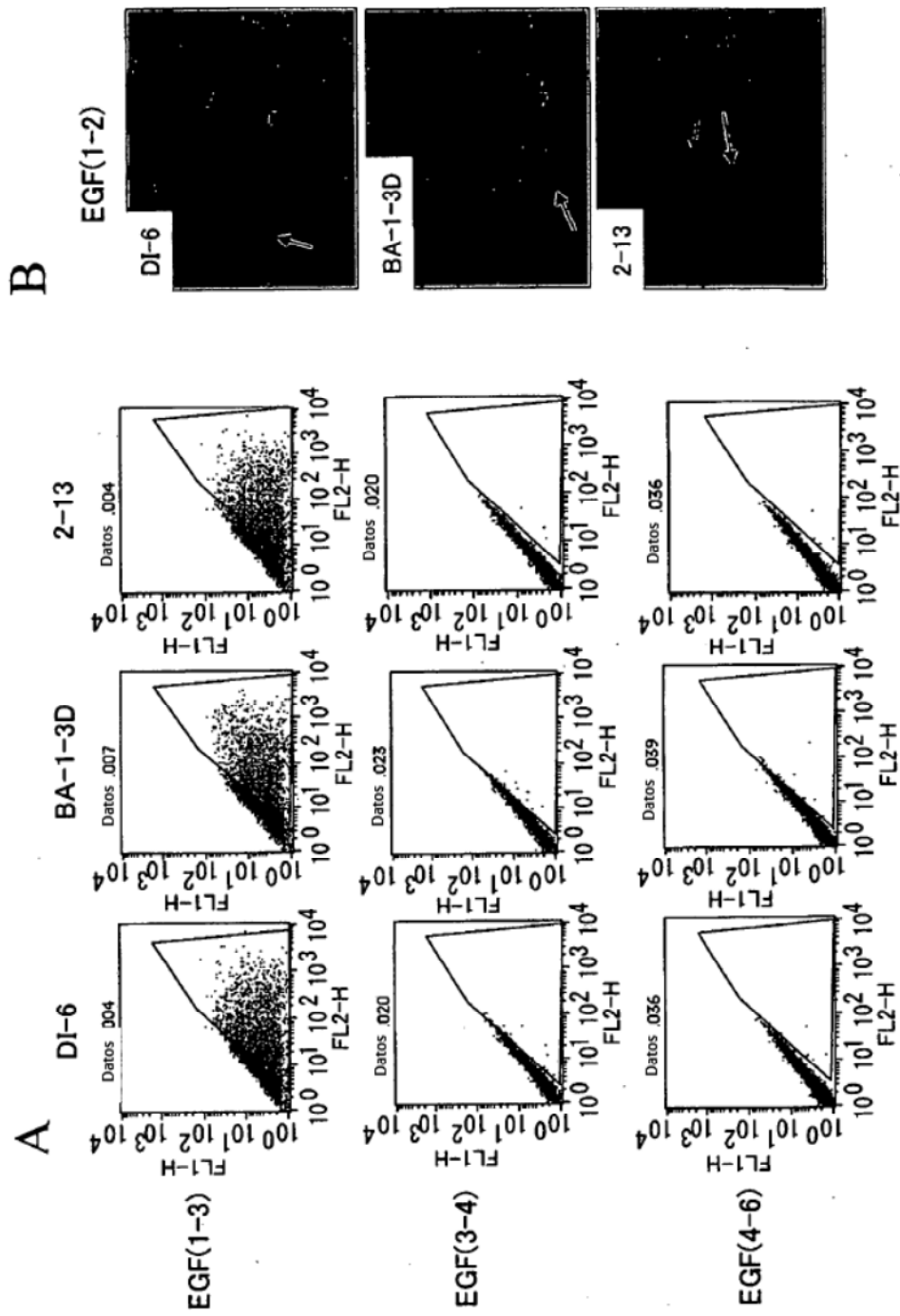


Fig. 10

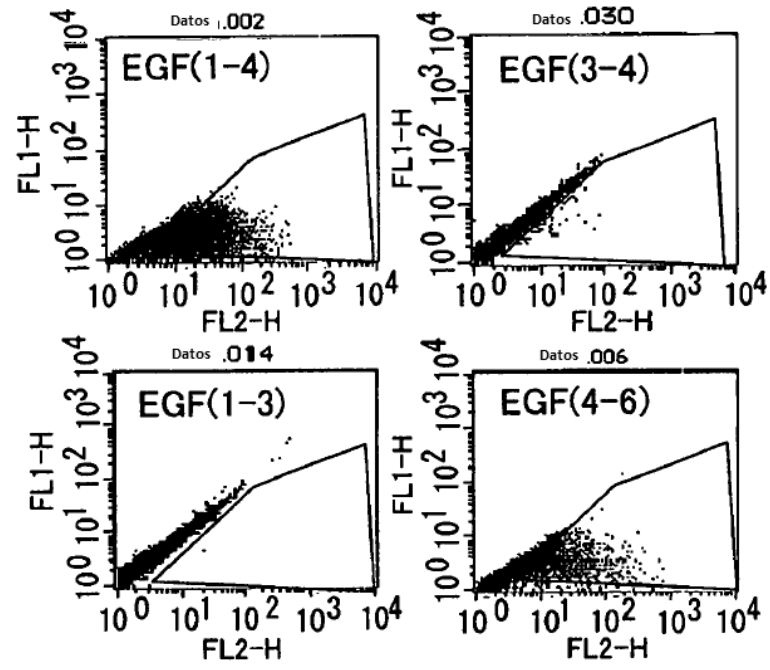


Fig. 11

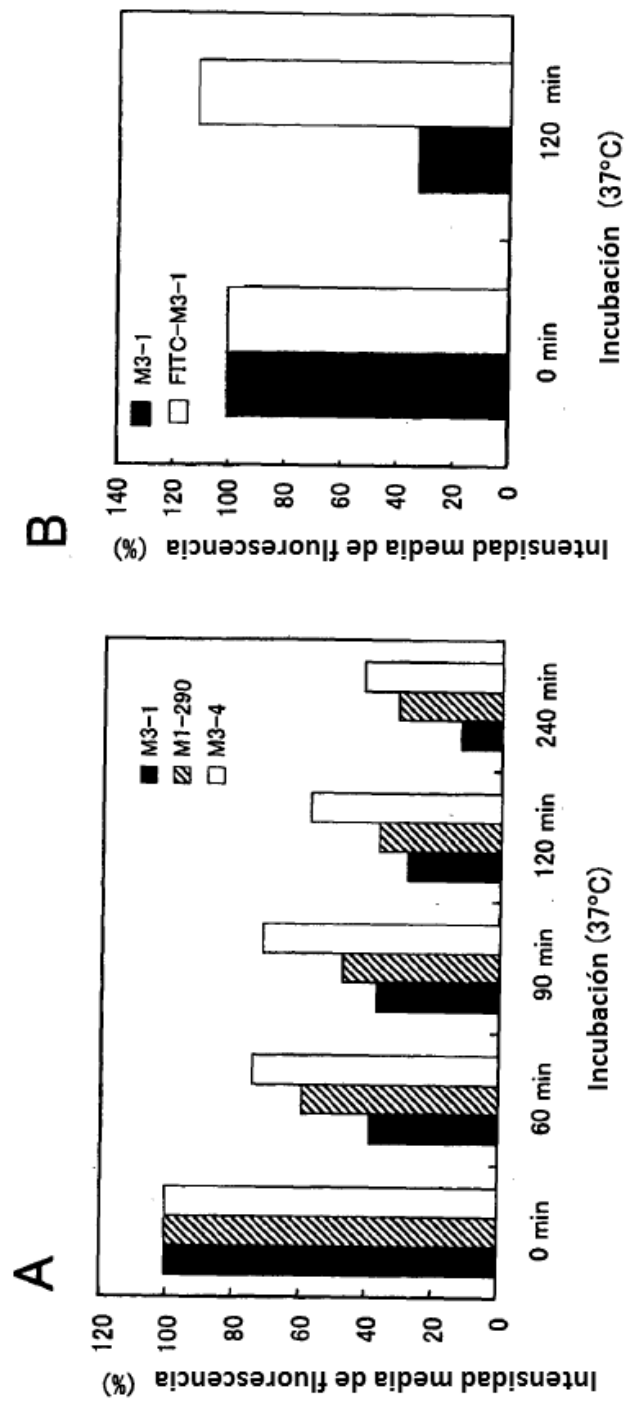


Fig. 12

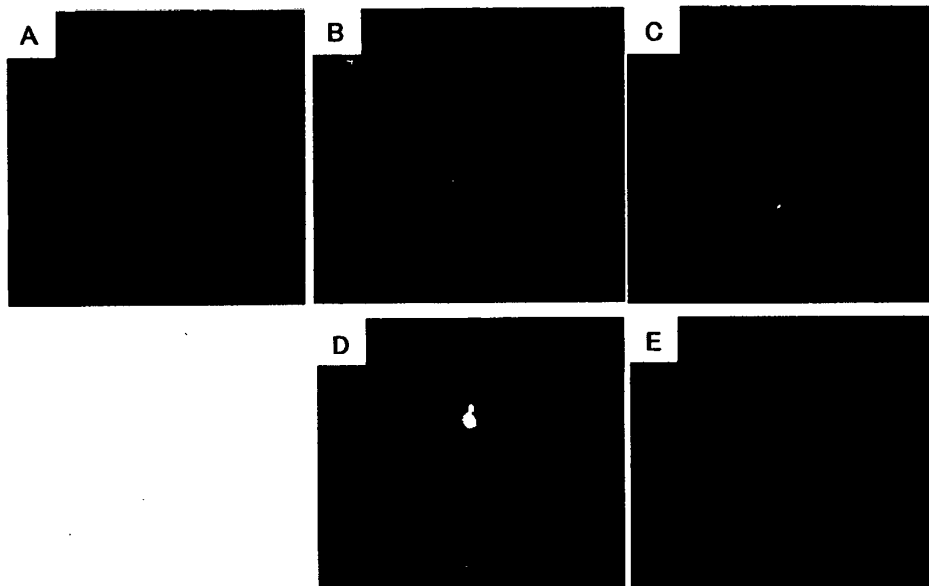


Fig. 13

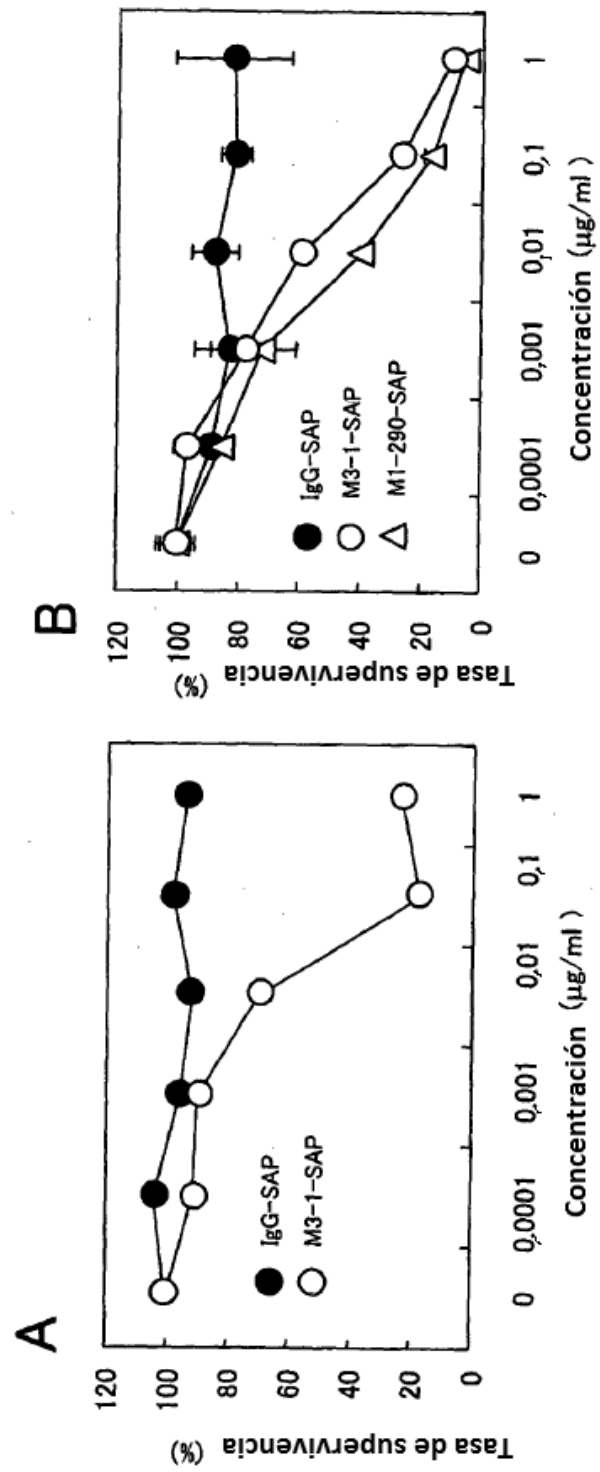


Fig. 14

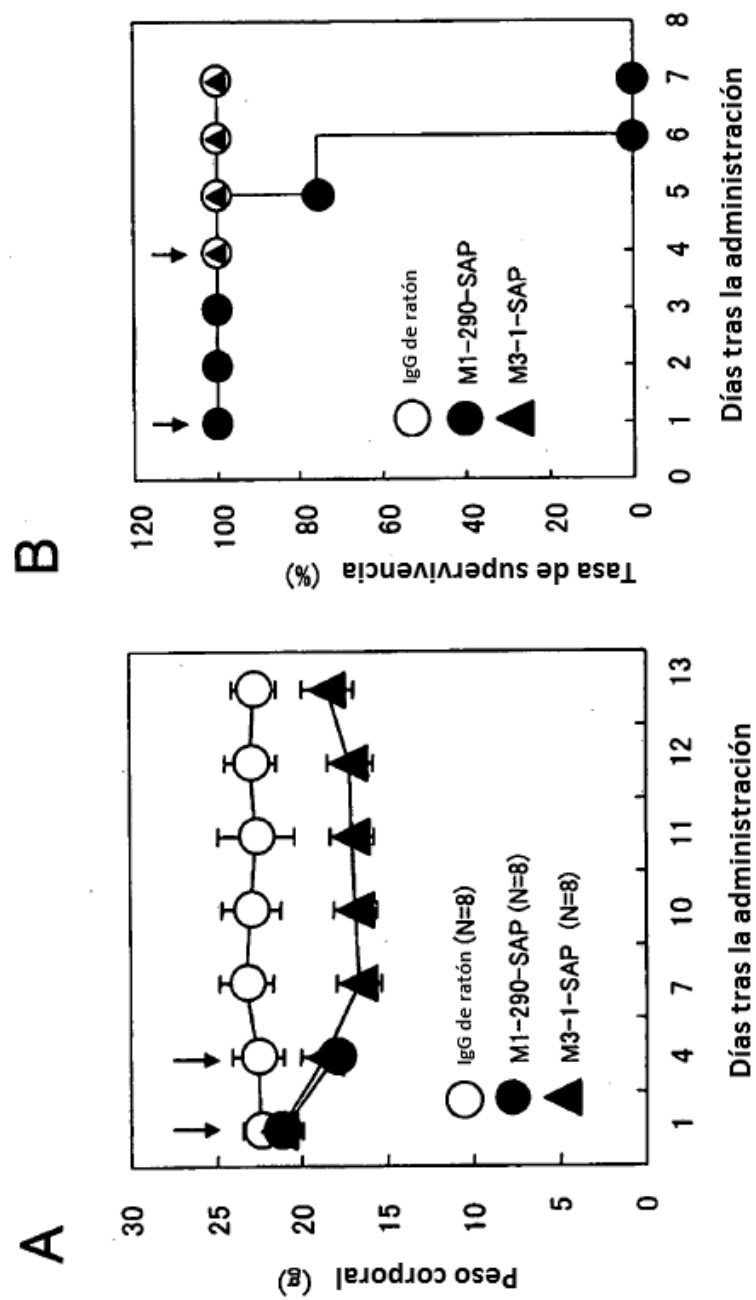


Fig. 15

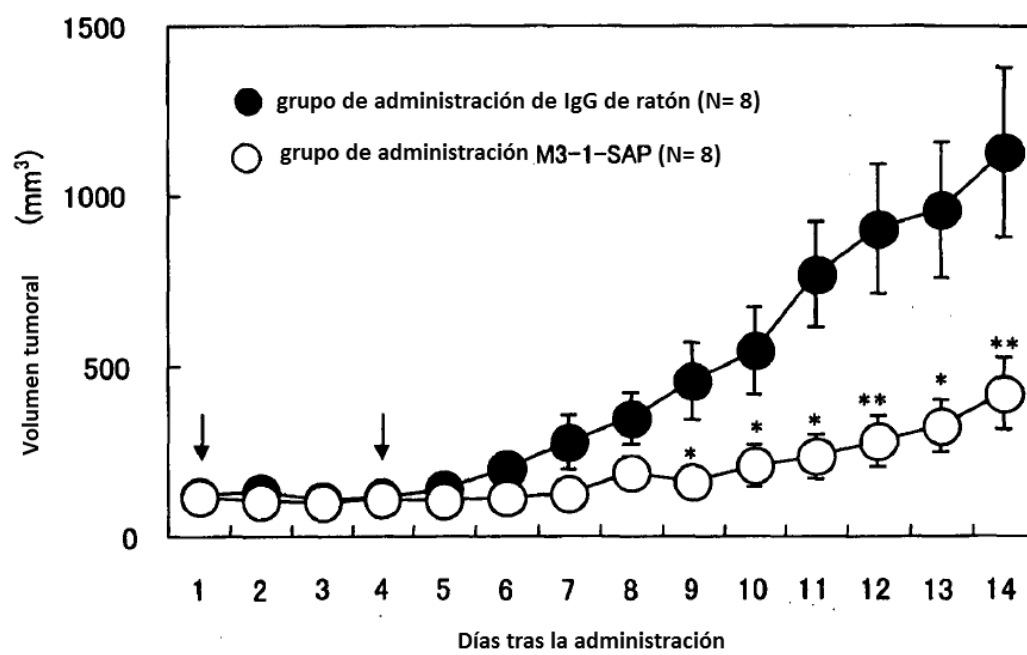


Fig. 16

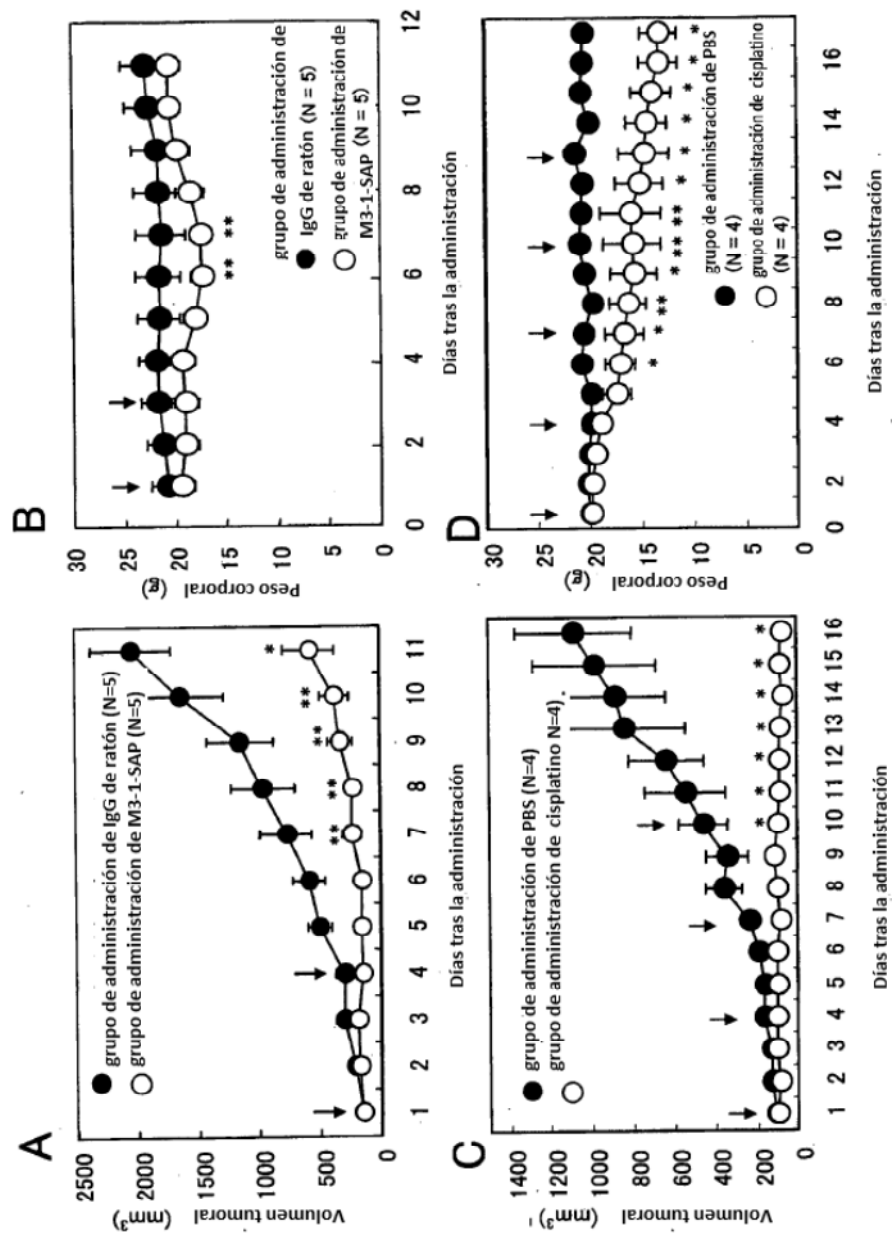


Fig. 17

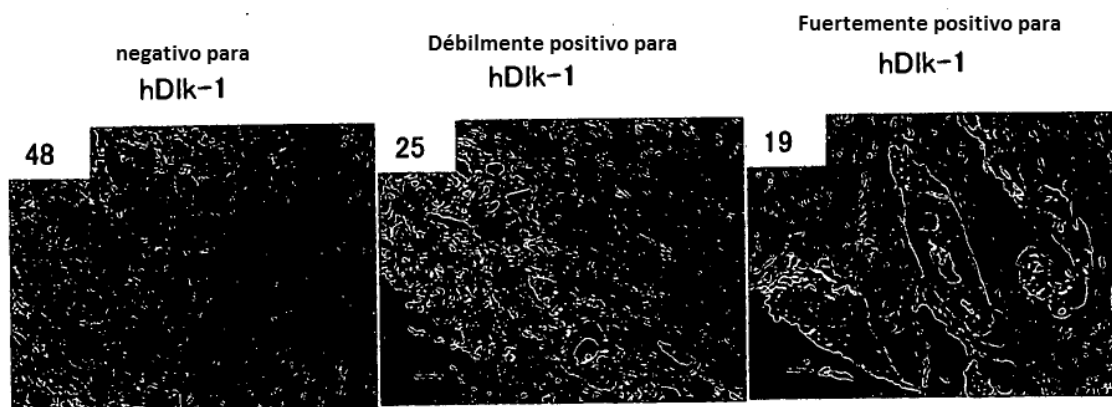


Fig. 18

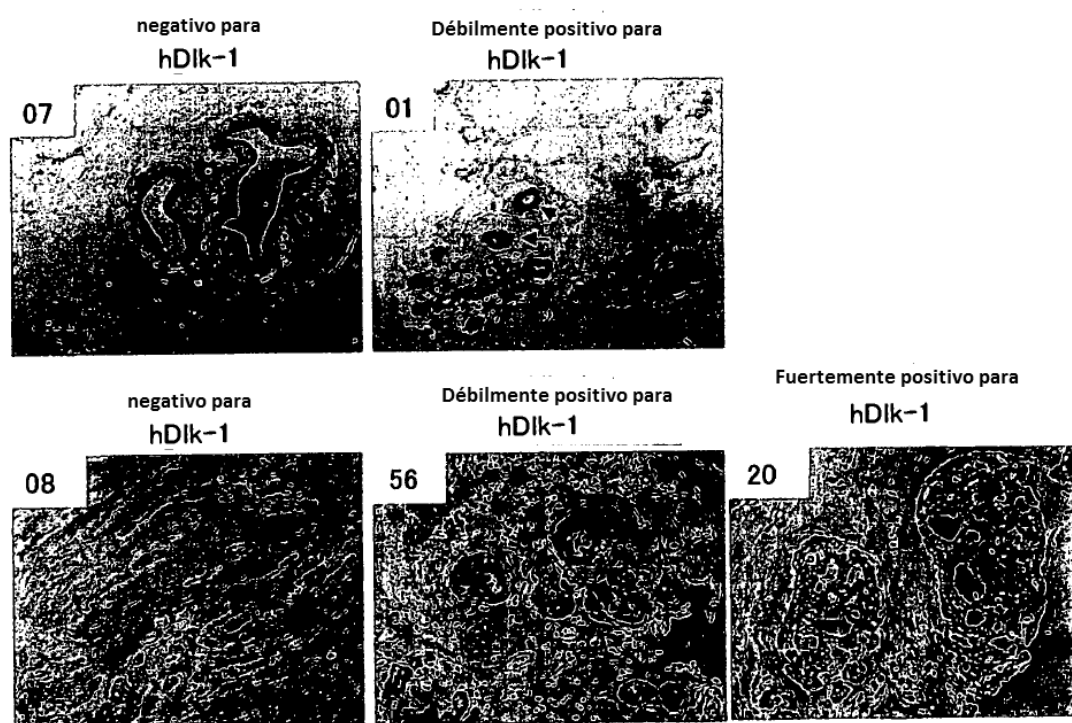


Fig. 19

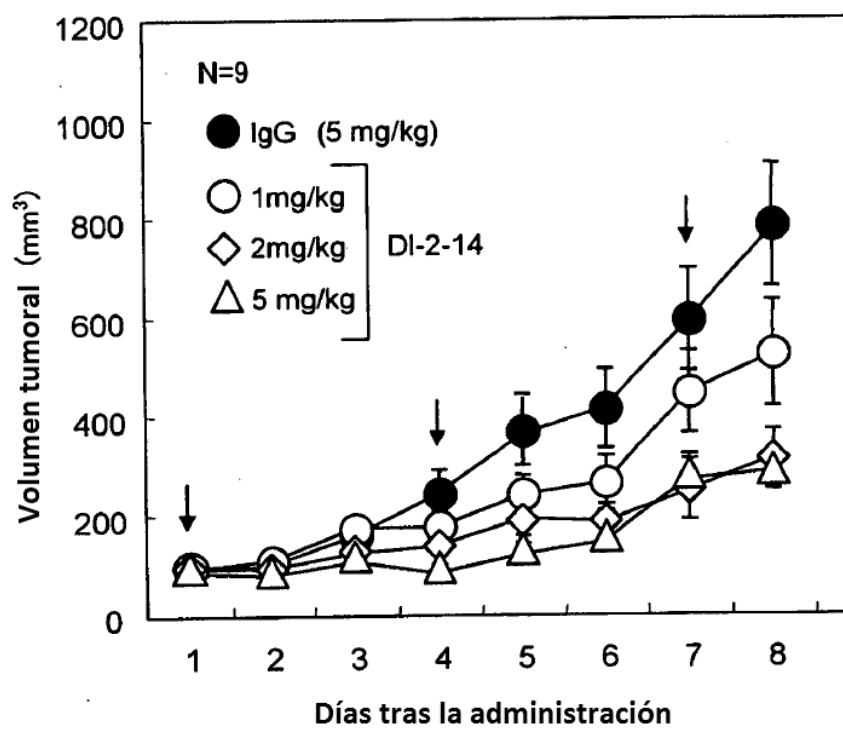


Fig. 20

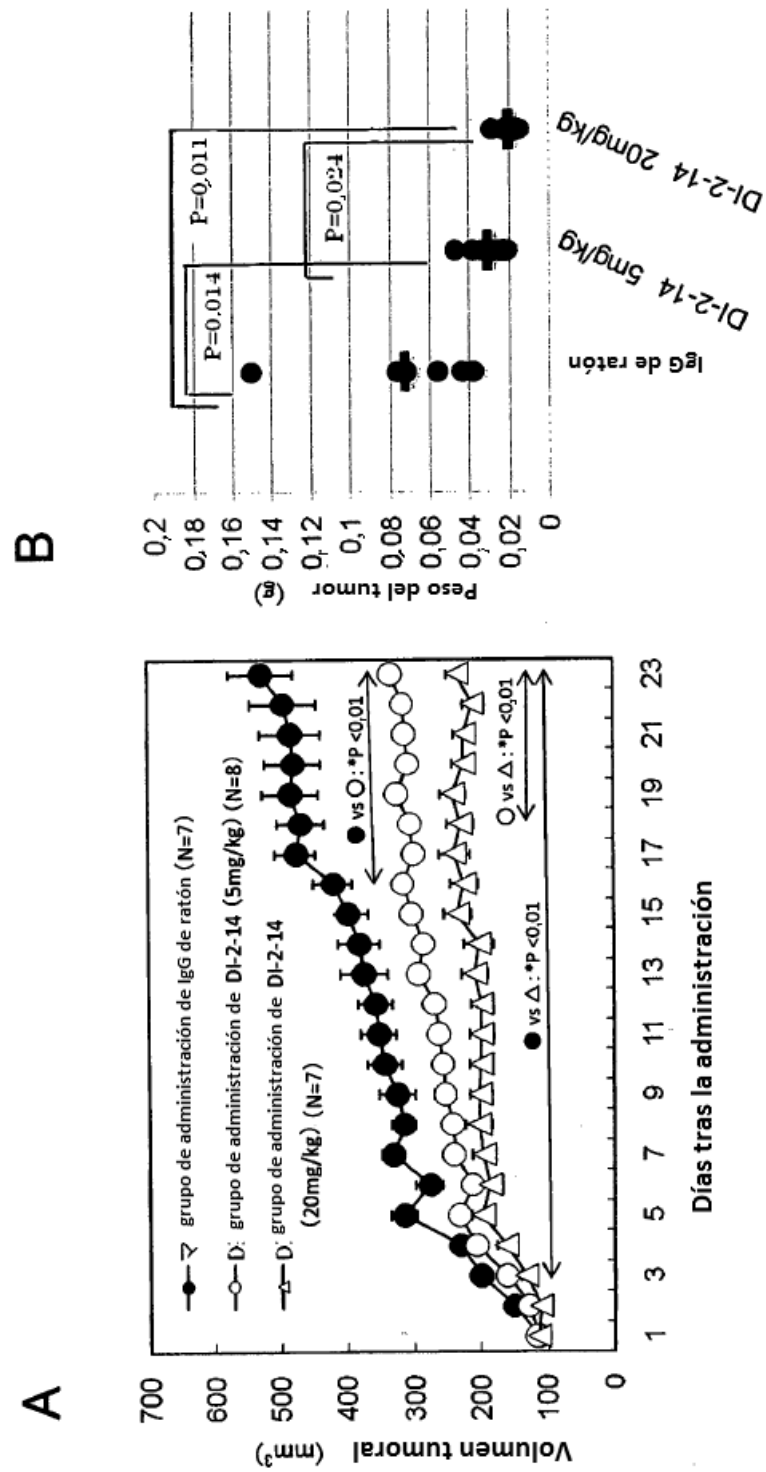


Fig. 21

ATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGGGTCAATTCAGAG
 M K C S W V I F F L M A V V T G V N S E
 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCAAGTTGTCC
 V Q L Q Q S G A E L V K P G A S V K L S
 TGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAGAGACACCTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCT
 C T A S G F N I R D T Y I H W V K Q R P
 GAGCAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCCGAATGGTAATCTTAAATATGAC
 E Q G L E W I G R I D P P N G N L K Y D
 CCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTG
P K F Q G K A T I T A D T S S N T A Y L
 CAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCAAGGTCTGATGGT
 Q F S S L T S E D T A V Y Y C A R S D G
 TACTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCC
Y S F A Y W G Q G T L V T V S A A

Fig. 22

ATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCTGGAGCCATTGGG
 M R C L A E F L G L L V L W I P G A I G

 GATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAGTATCC
D I V M T Q A A P S V P V T P G E S V S

 ATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTACTTGTATTGG
 I S C R S S K S L L H S N G N T Y L Y W

 TTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATGTCCAACCTTGCC
 F L Q R P G Q S P Q L L I Y R M S N L A

 TCAGGAGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTGAGGAAGTCTTTCACACTGAGAATC
S G V P D R F S G S G S G T A F T L R I

 AGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACATGTAGAATATCCA
 S R V E A E D V G V Y Y C M Q H V E Y P

 TTCACGTTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAA
F T F G S G T K L E I K

Fig. 23

SpeI

ACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTACAGG

M K C S W V I F F L M A V V T G

GTCAATTCAGAGGTTCACTGCAGCAGTCTGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCA

V N S E V Q L Q Q S G A E L V K P G A S

GTCAAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAGAGACACCTATATACACTGGGTG

V K L S C T A S G F N I R D T Y I H W V

AAGCAGAGGCCTGAGCAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCCGAATGGTAAT

K Q R P E Q G L E W I G R I D P P N G N

CTTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAAC

L K Y D P K F Q G K A T I T A D T S S N

ACAGCCTACCTGCAGTTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCA

T A Y L Q F S S L T S E D T A V Y Y C A

AGGTCTGATGGTTACTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

R S D G Y S F A Y W G Q G T L V T V S A

HindIII

GGTGAGTCCTAACTTCAAGCTT

Fig. 24

NheI

GCTAGCACCACCATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCT

M R C L A E F L G L L V L W I P

GGAGCCATTGGGGATATTGTGATGACTCAGGCTGCACCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGA

G A I G D I V M T Q A A P S V P V T P G

GAGTCAGTATCCATCTCCTGCAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACT

E S V S I S C R S S K S L L H S N G N T

TACTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATG

Y L Y W F L Q R P G Q S P Q L L I Y R M

TCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGAACCTGCTTTC

S N L A S G V P D R F S G S G S G T A F

ACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACAT

T L R I S R V E A E D V G V Y Y C M Q H

GTAGAATATCCATTACGTTCCGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAAACGTAAGTAGACT

V E Y P F T F G S G T K L E I K

EcoRI

TTGCGAATTC

Fig. 25

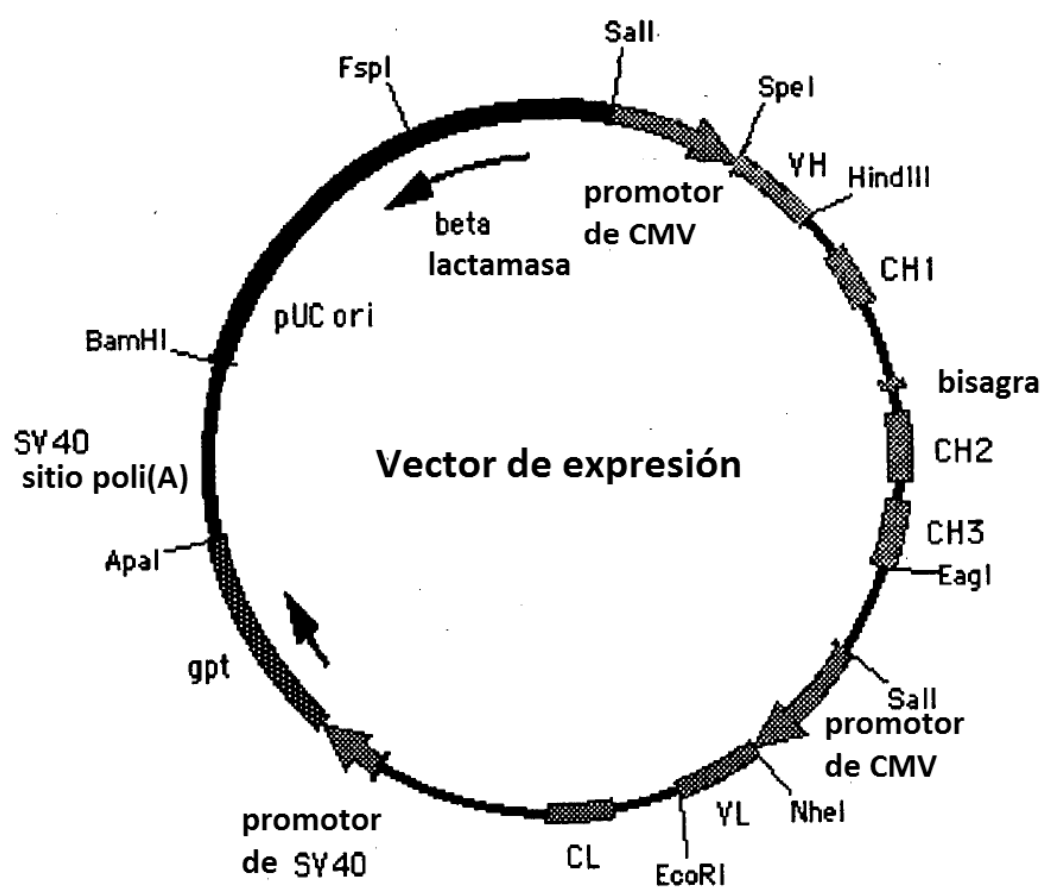


Fig. 26

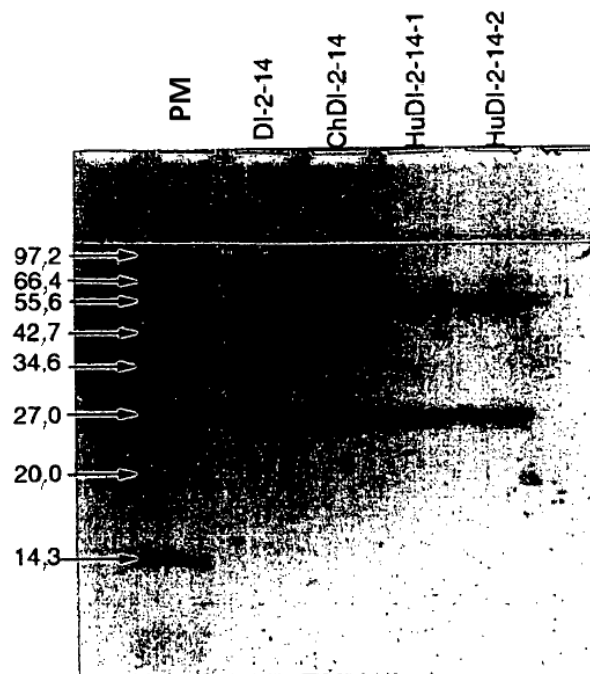


Fig. 27

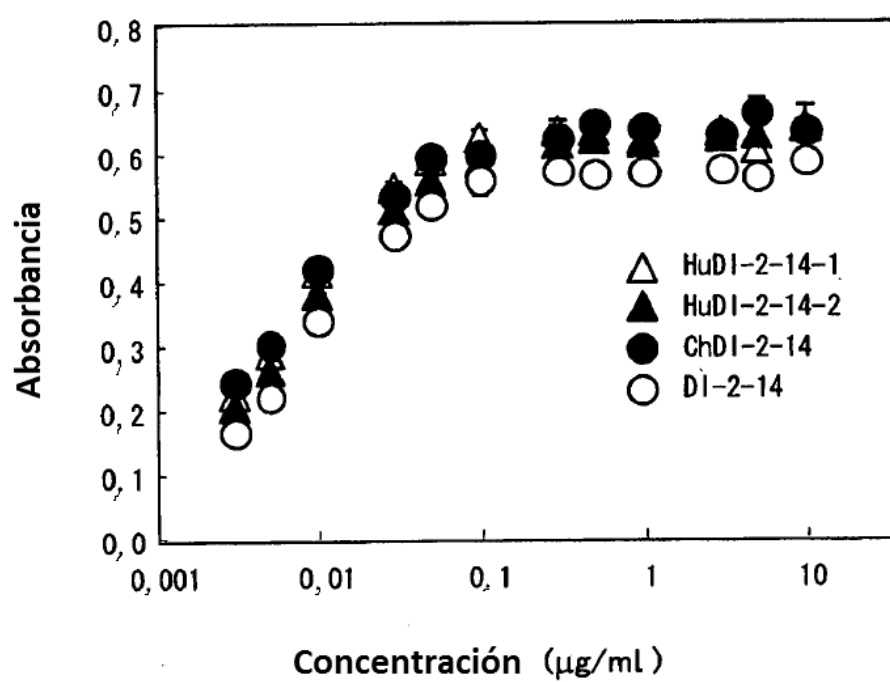


Fig. 28A

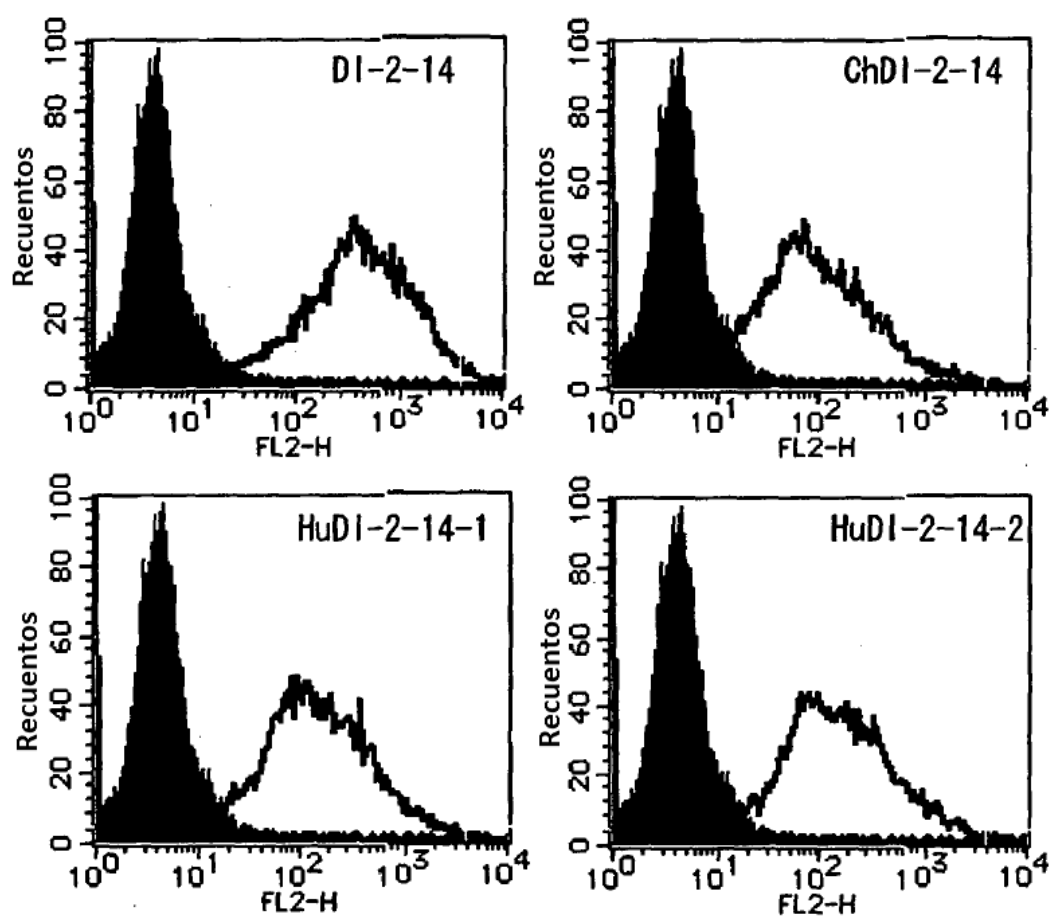


Fig. 28B

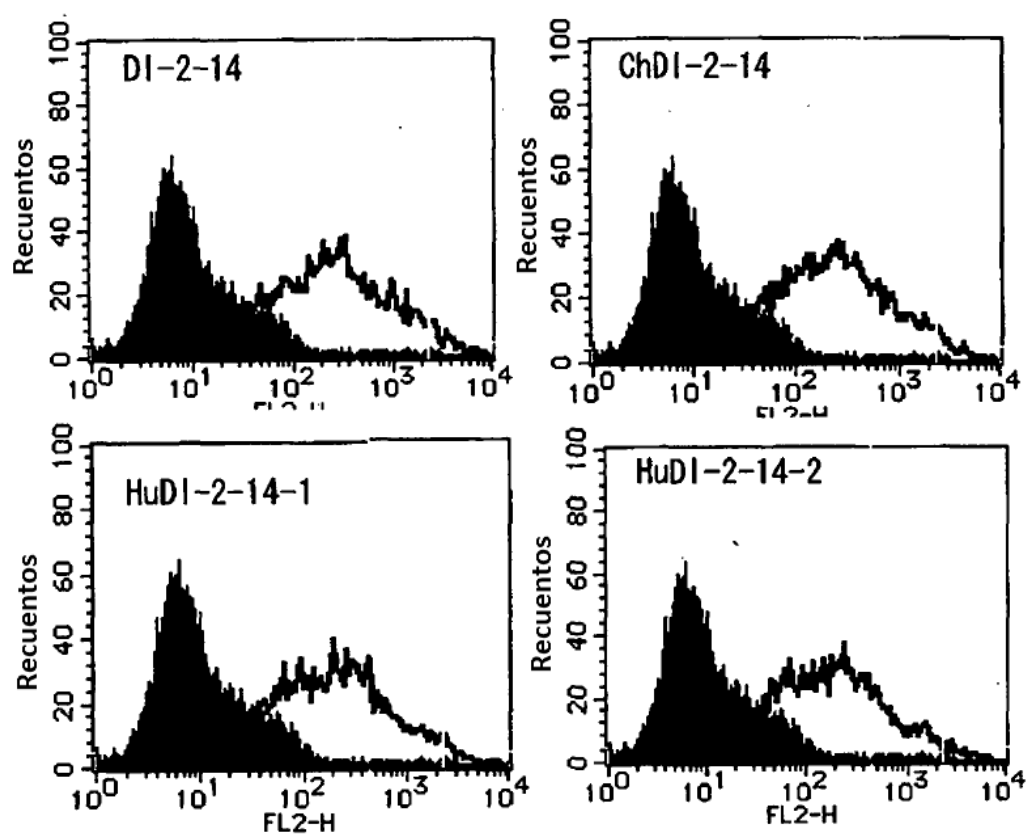


Fig. 29

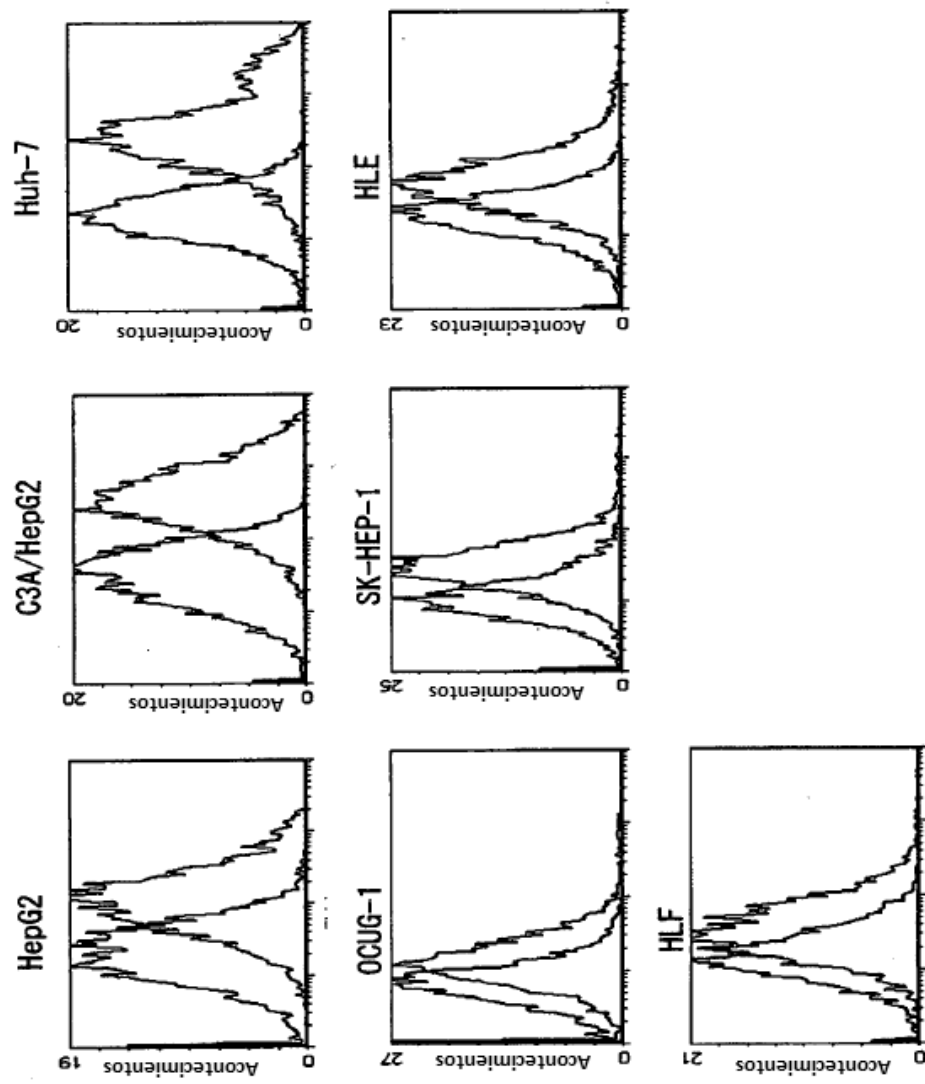


Fig. 30

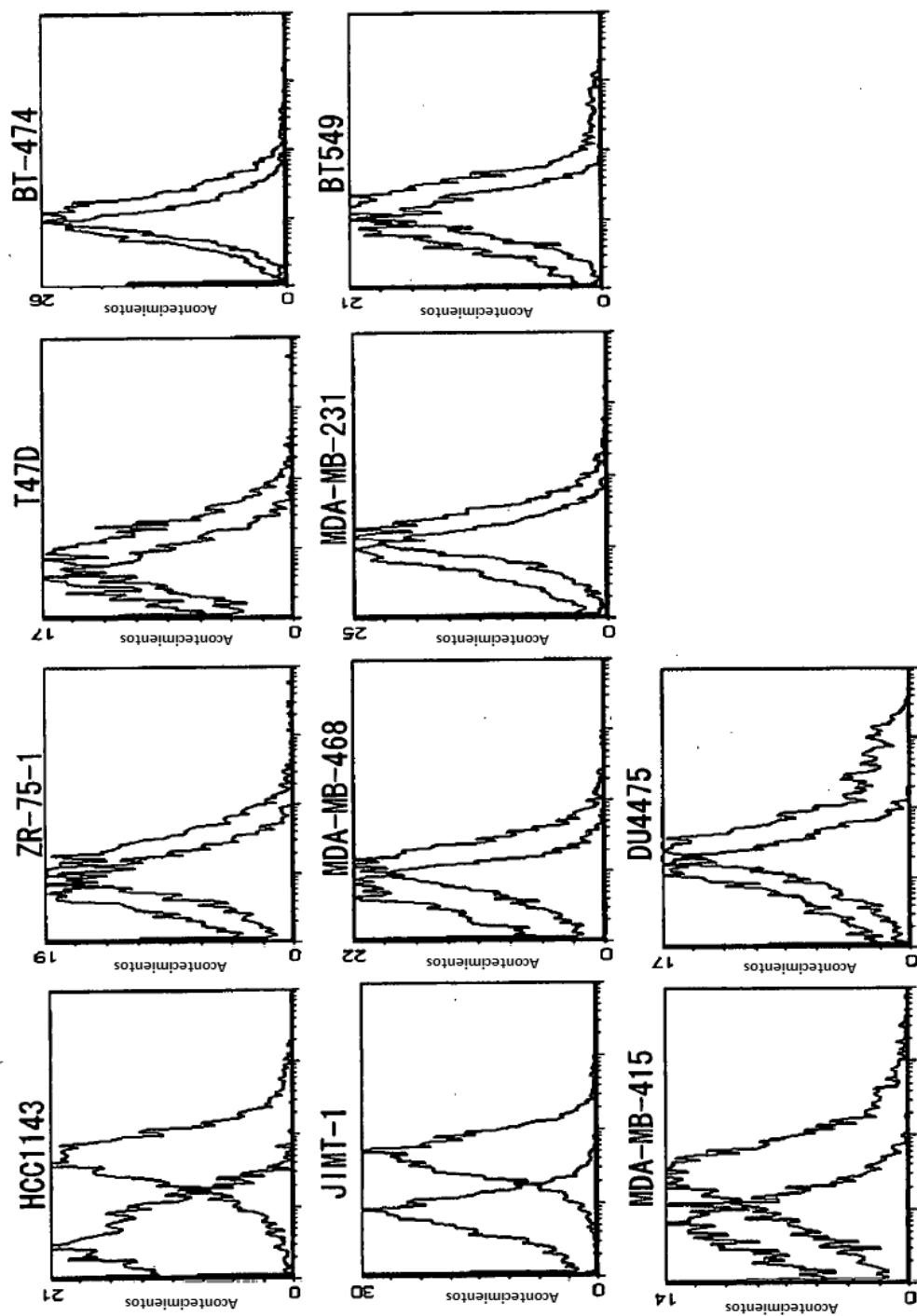


Fig. 31

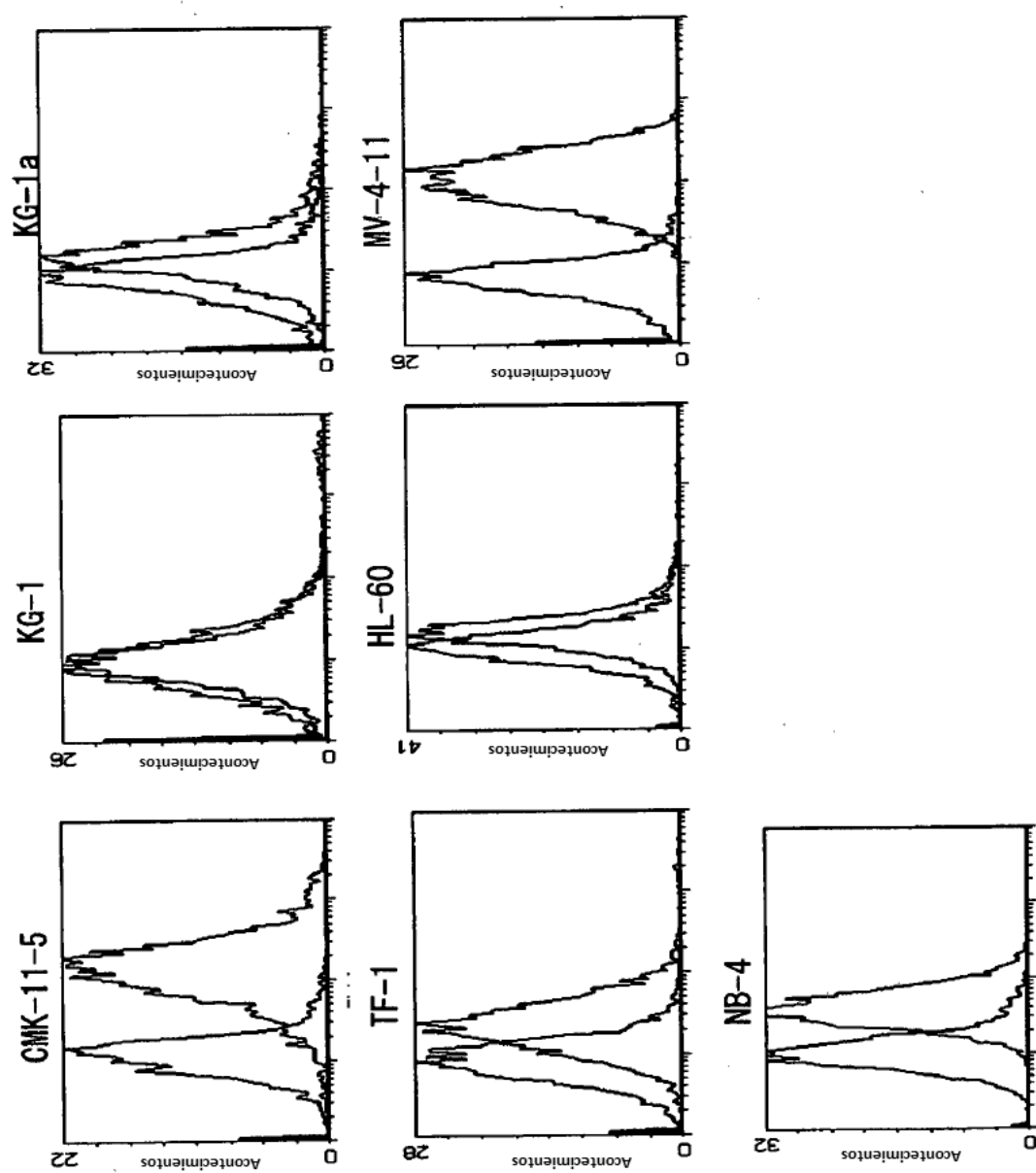


Fig. 32

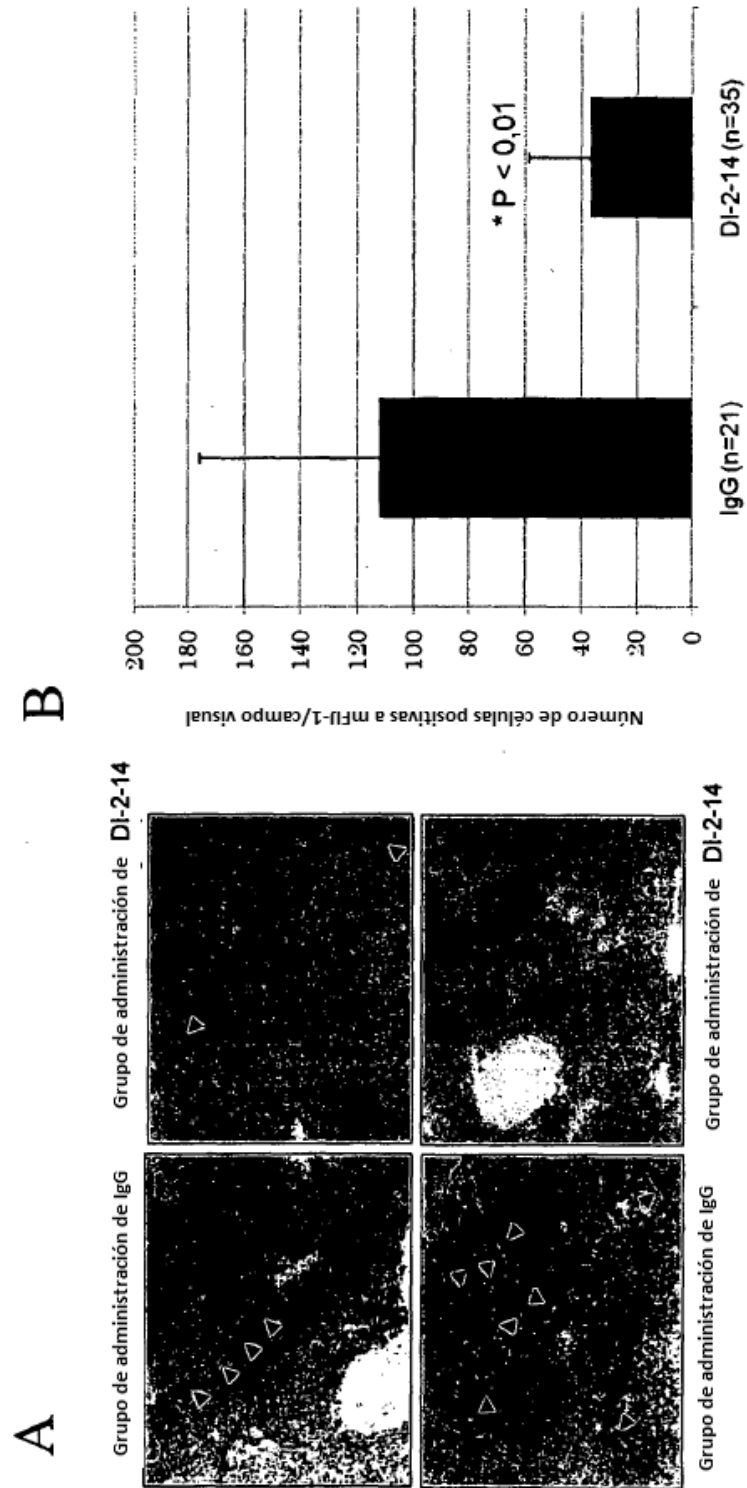


Fig. 33

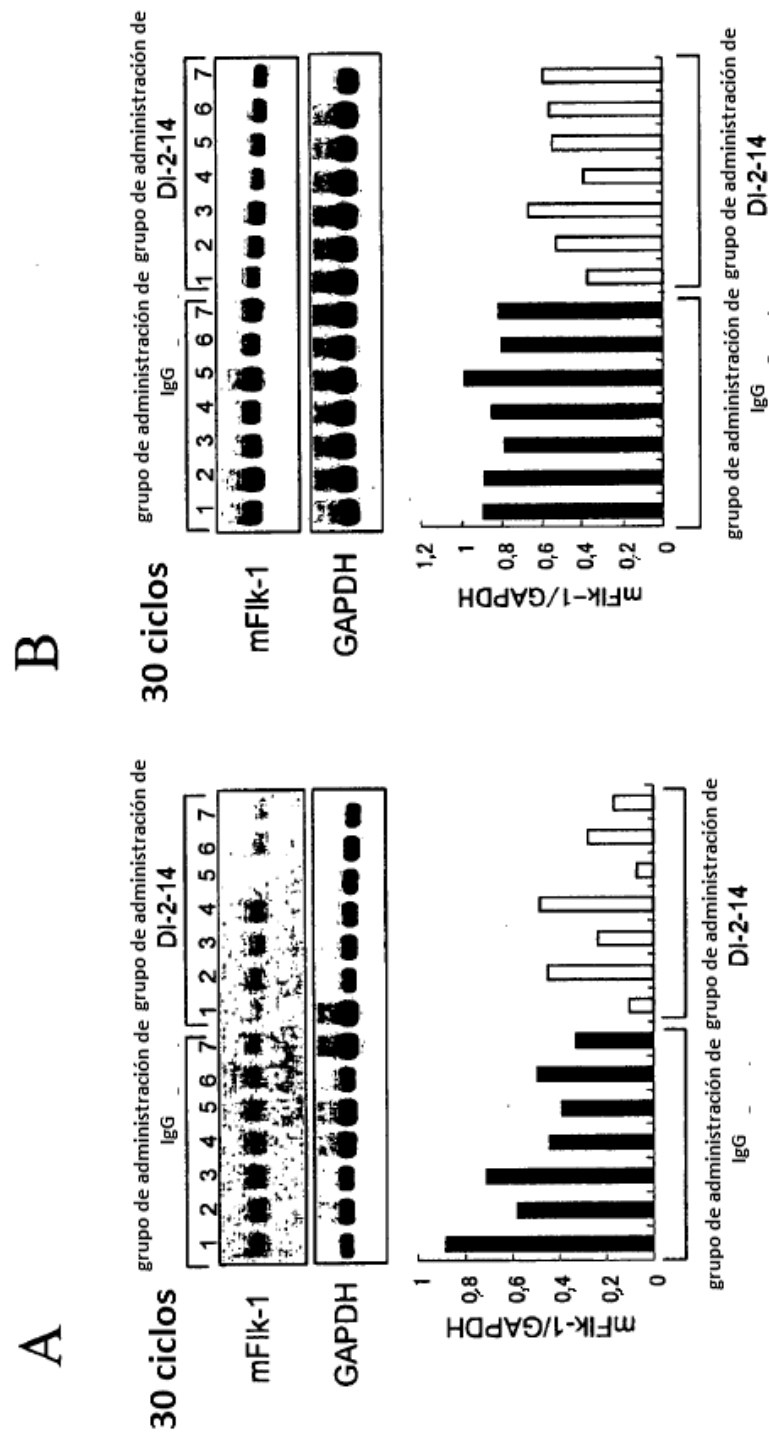


Fig. 34

	1	2	3
	123456789	0123456789	0123456789
DI-2-14 VH	EVQLQQSGA	ELVKPGASVK	LSCTASGFNI <u>RDYIH</u> WVKQ
HuDI-2-14 VH#1	QVQLVQSGA	EVKKPGSSVK	VSKASGFNI <u>RDYIH</u> WVRQ
HuDI-2-14 VH#2	QVQLVQSGA	EVKKPGSSVK	VSKASGFNI <u>RDYIH</u> WVRQ
U00583	QVQLVQSGA	EVKKPGSSVK	VSKASGGTF S-----WVRQ
			(CDR1)

	4	5	6	7
	0123456789	01223456789	0123456789	0123456789
		a		
DI-2-14 VH	RPEQGLEWIG	<u>RIDPP</u> GNLKY	<u>DPKFQ</u> GKATI	TADTSSNTAY
HuDI-2-14 VH#1	APGQGLEWIG	<u>RIDPP</u> GNLKY	<u>DPKFQ</u> GKATI	TADTSTSTAY
HuDI-2-14 VH#2	APGQGLEWIG	<u>RIDPP</u> GNLKY	<u>DPKFQ</u> GKATI	TADTSTSTAY
U00583	APGQGLEWMG	-----	-----RVTI	TADKSTSTAY
				(CDR2)

	8	9	10	11
	0122223456789	0123456789	0123456789	0123
		abc		
DI-2-14 VH	LQFSSLTSED	TAV YYCARSDGYS	<u>FAYWG</u> QGLV	TVSA
HuDI-2-14 VH#1	MEFSSLRSED	TAV YYCARSDGYS	<u>FAYWG</u> QGLV	TVSS
HuDI-2-14 VH#2	MELSSLRSED	TAV YYCARSDGYS	<u>FAYWG</u> QGLV	TVSS
U00583	MELSSLRSED	TAV YYCAR-----	---WGQGLV	TVSS
				(CDR3)

CDR1: SYAIS
 CDR2: GIPIFGTANYAQKFQG
 CDR3: GDILTGLNWFD

Fig. 35

	1	2
	123456789	0123456789 012345677777789
		abcde
DI-2-14 VL	DIVMTQAAP SVPVTPGESV	SISCRSSKSLLSNG
HuDI-2-14 VL	DIVMTQSPL SLPVTPGEPA	SISCRSSKSLLSNG
X72467	DIVMTQSPL SLPVTPGEPA	SISC-----
		(CDR1)

	3	4	5	6
	0123456789	0123456789	0123456789	0123456789
DI-2-14 VL	<u>NTYLYWFLQR</u>	PGQSPQLLIY	<u>RMSNLASGVP</u>	DRFSGSGSGT
HuDI-2-14 VL	<u>NTYLYWFLQK</u>	PGQSPQLLIY	<u>RMSNLASGVP</u>	DRFSGSGSGT
X72467	-----WYLQK	PGQSPQLLIY	-----GVP	DRFSGSGSGT
				(CDR2)

	7	8	9	10
	0123456789	0123456789	0123456789	01234567
DI-2-14 VL	AFTLRISRVE	AEDVGVIYCM	<u>QHVEYPFTFG</u>	SGTKLEIK
HuDI-2-14 VL	<u>AFTLKISRVE</u>	AEDVGVIYCM	<u>QHVEYPFTFG</u>	QGTKVEIK
X72467	DFTLKISRVE	AEDVGVIYCM	-----FG	QGTKVEIK
				(CDR3)

CDR1: RSSQSLLHSNGYNYLD
 CDR2: LGSNRAS
 CDR3: MQALQTPWT

Fig. 36A

SpeI

GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGG

M K C S W V I F F L M A V V T G

GTCAATTCACAGGTTACAGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGTCCTCA

V N S Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S

GTCAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAGAGACACCTATATACACTGGGTG

V K V S C K A S G F N I R D T Y I H W V

CGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCCGAATGGTAAT

R Q A P G Q G L E W I G R I D P P N G N

CTTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCACGAGC

L K Y D P K F Q G K A T I T A D T S T S

ACAGCCTACATGGAGTTCAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCA

T A Y M E F S S L R S E D T A V Y Y C A

AGGTCTGATGGTTACTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA

R S D G Y S F A Y W G Q G T L V T V S S

HindIII

GGTGAGTCTGCTGTAAAGCTTCCC

Fig. 36B

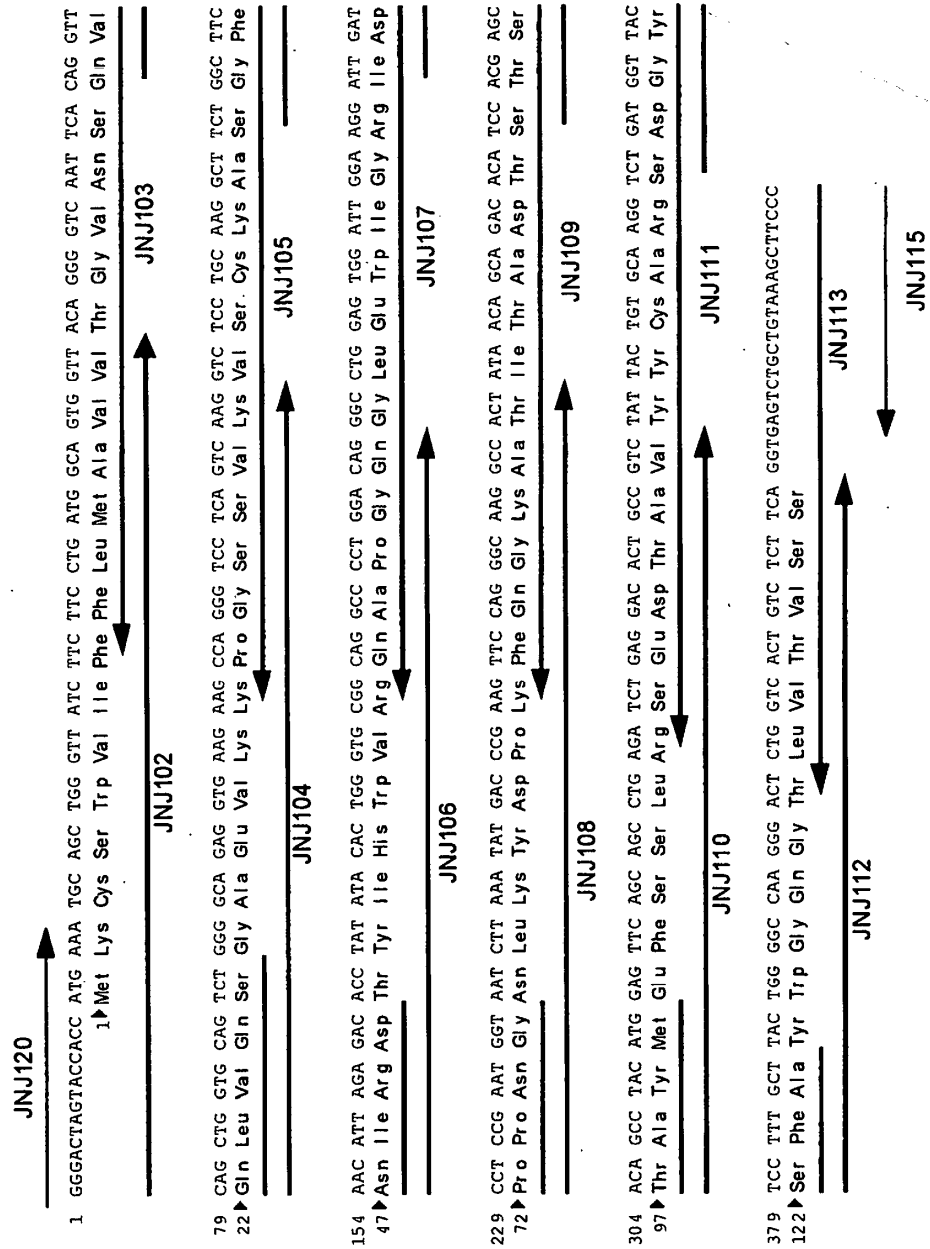


Fig. 37A

SpeI

GGGACTAGTACCACCATGAAATGCAGCTGGGTTATCTTCTCCTGATGGCAGTGGTTACAGGG
M K C S W V I F F L M A V V T G

GTCAATTCACAGGTTCACTGCTGGTGCAGTCTGGGGCAGAGGTGAAGAAGCCAGGGTCTCA
V N S Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S

GTCAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTTCAACATTAGAGACACCTATATACACTGGGTG
V K V S C K A S G F N I R D T Y I H W V

CGGCAGGCCCTGGACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTCCGAATGGTAAT
R Q A P G Q G L E W I G R I D P P N G N

CTTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGACACATCCACGAGC
L K Y D P K F Q G K A T I T A D T S T S

ACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCCGTCTATTACTGTGCA
T A Y M E L S S L R S E D T A V Y Y C A

AGGTCTGATGGTTACTCCTTTGCTTACTGGGGCCAAGGAAGTCTGGTCACTGTCTCTTCA
R S D G Y S F A Y W G Q G T L V T V S S

HindIII

GGTGAGTCTGCTGTAAAGCTTCCC

Fig. 37B

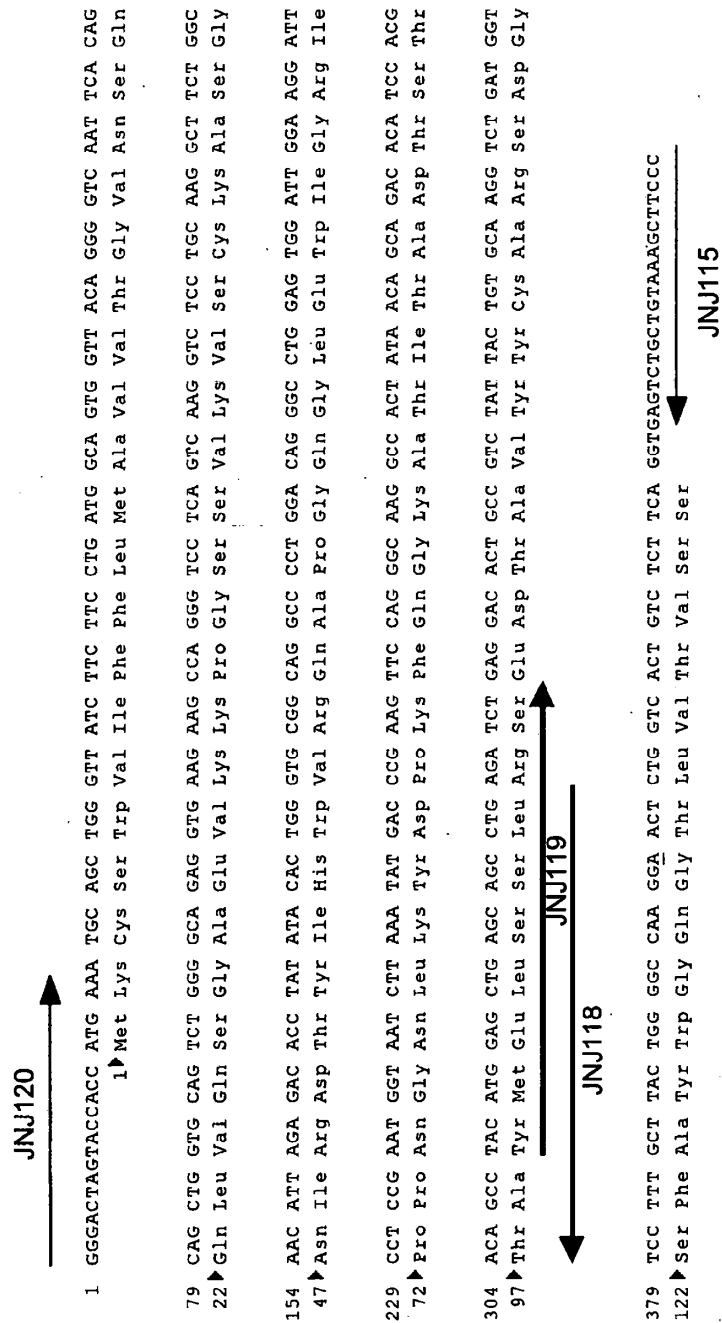


Fig. 38A

NheI

GGGCTAGCACCACCATGAGGTGCCTAGCTGAGTTCCTGGGGCTGCTTGTGCTCTGGATCCCT

M R C L A E F L G L L V L W I P

GGAGCCATTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTCTCTCTGCCTGTCACTCCTGGA

G A I G D I V M T Q S P L S L P V T P G

GAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGCAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACT

E P A S I S C R S S K S L L H S N G N T

TACTTGTATTGGTTCCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATATCGGATG

Y L Y W F L Q K P G Q S P Q L L I Y R M

TCCAACCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTGAGGAAGTCTTTC

S N L A S G V P D R F S G S G S G T A F

ACACTGAAAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATTACTGTATGCAACAT

T L K I S R V E A E D V G V Y Y C M Q H

GTAGAATATCCATTACGTTTCGGCCAAGGACAAAGGTGGAAATCAAACGTGAGTAGAAT

V E Y P F T F G Q G T K V E I K

EcoRI

TTAAAGAATTC CCC

Fig. 38B

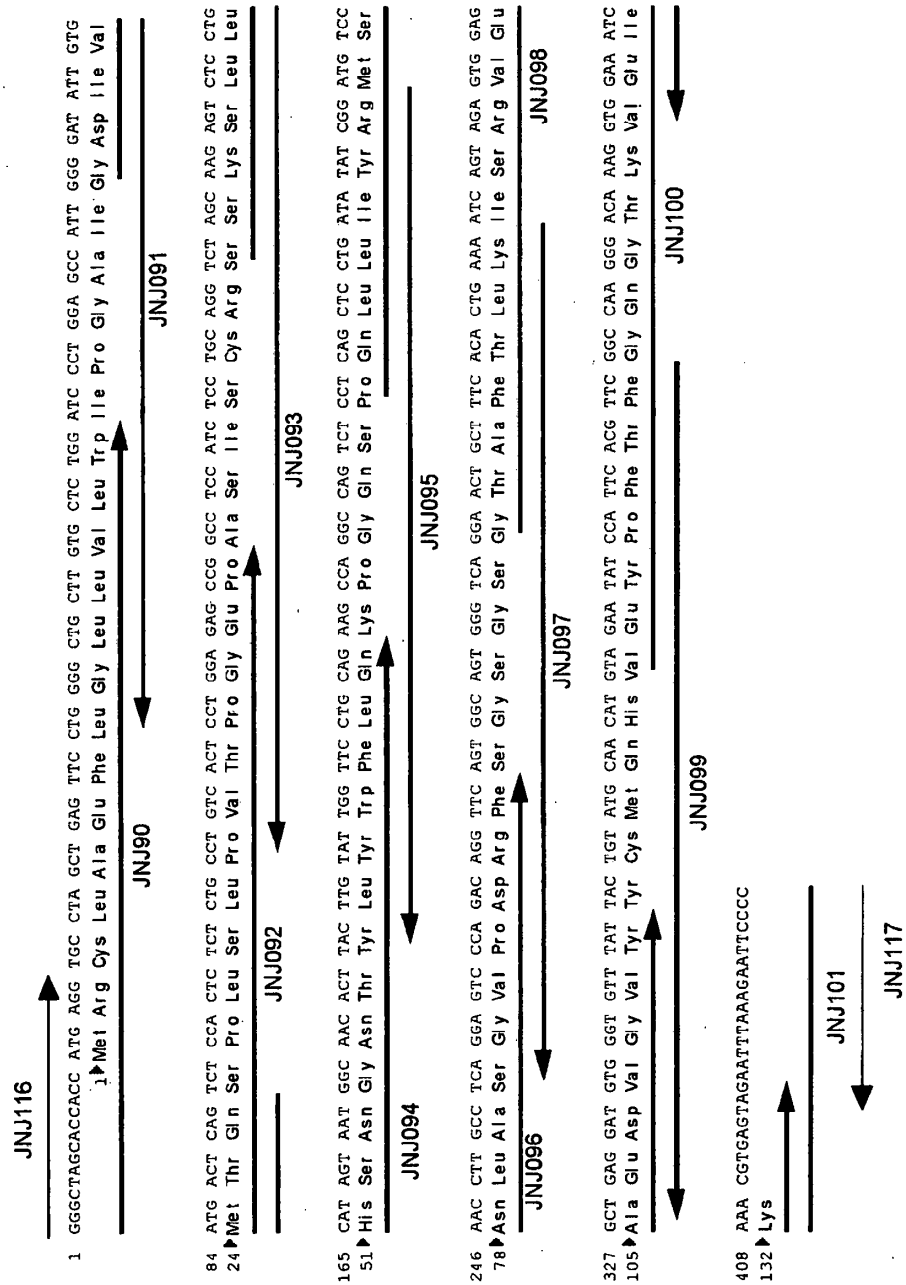


Fig. 39

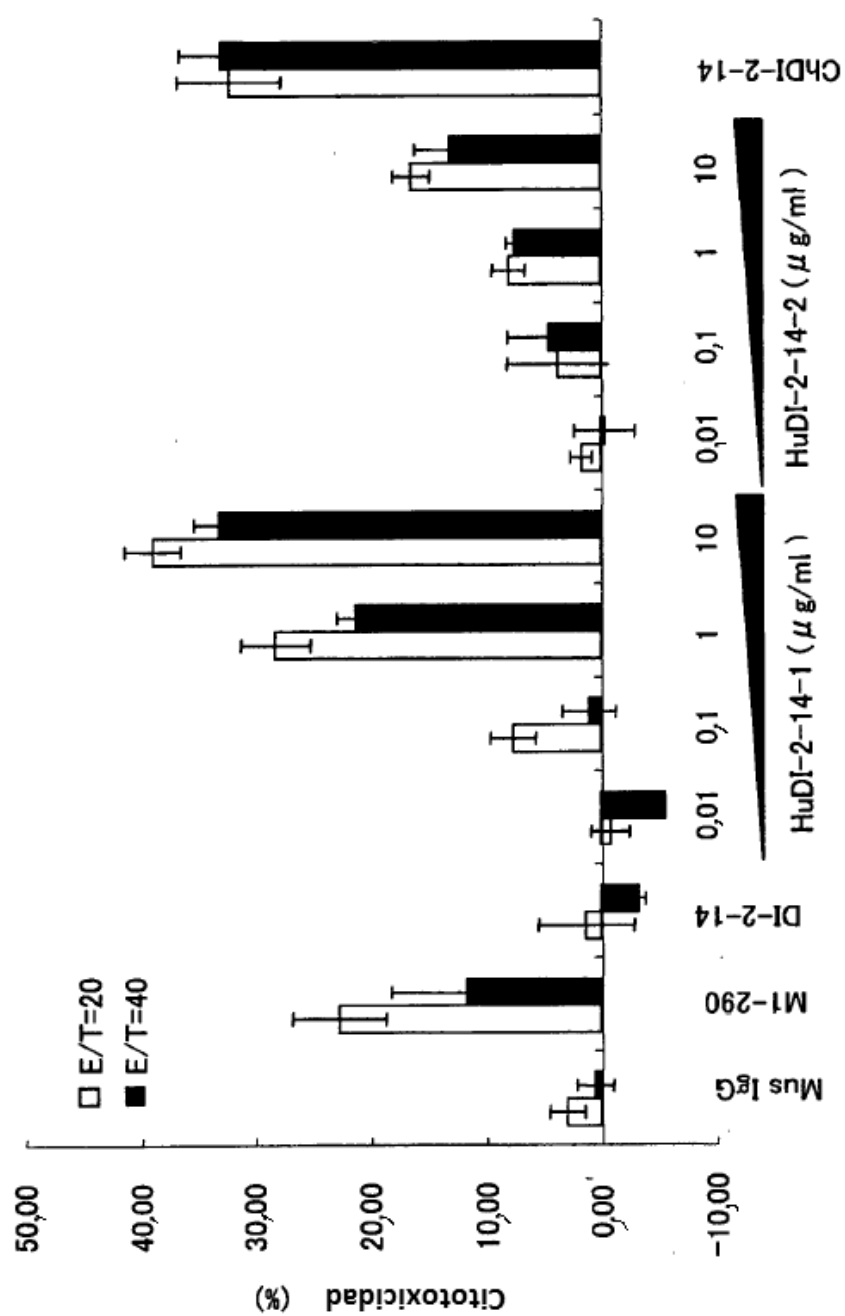


Fig. 40

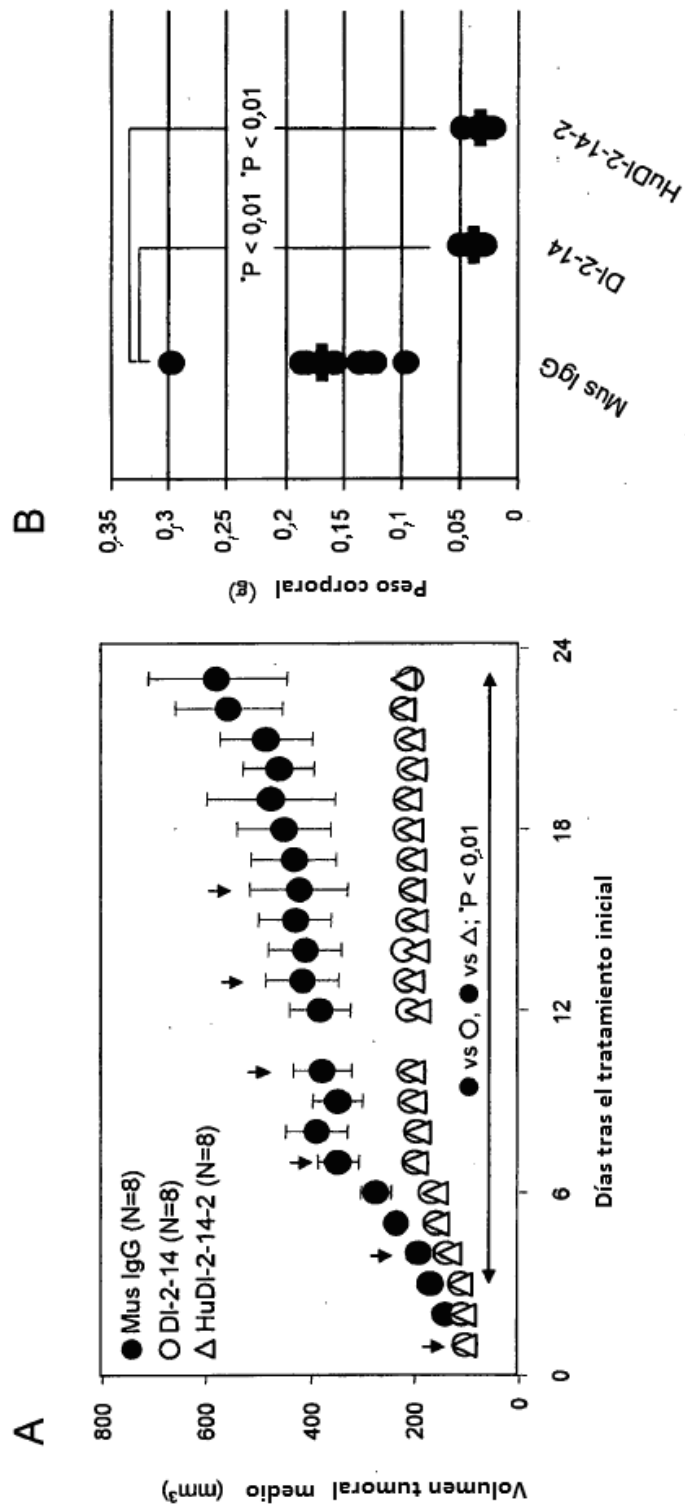


Fig. 41

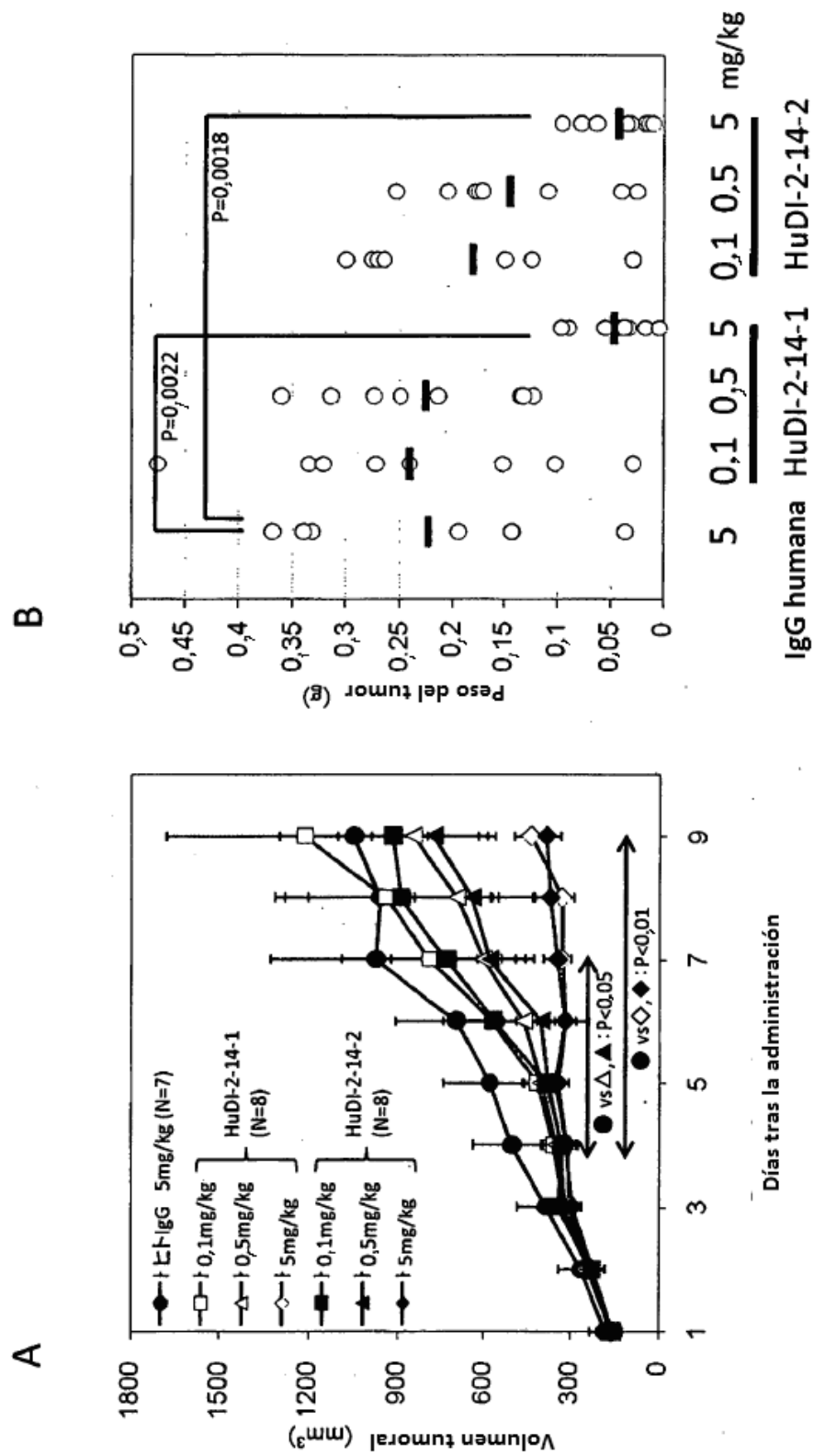


Fig. 42

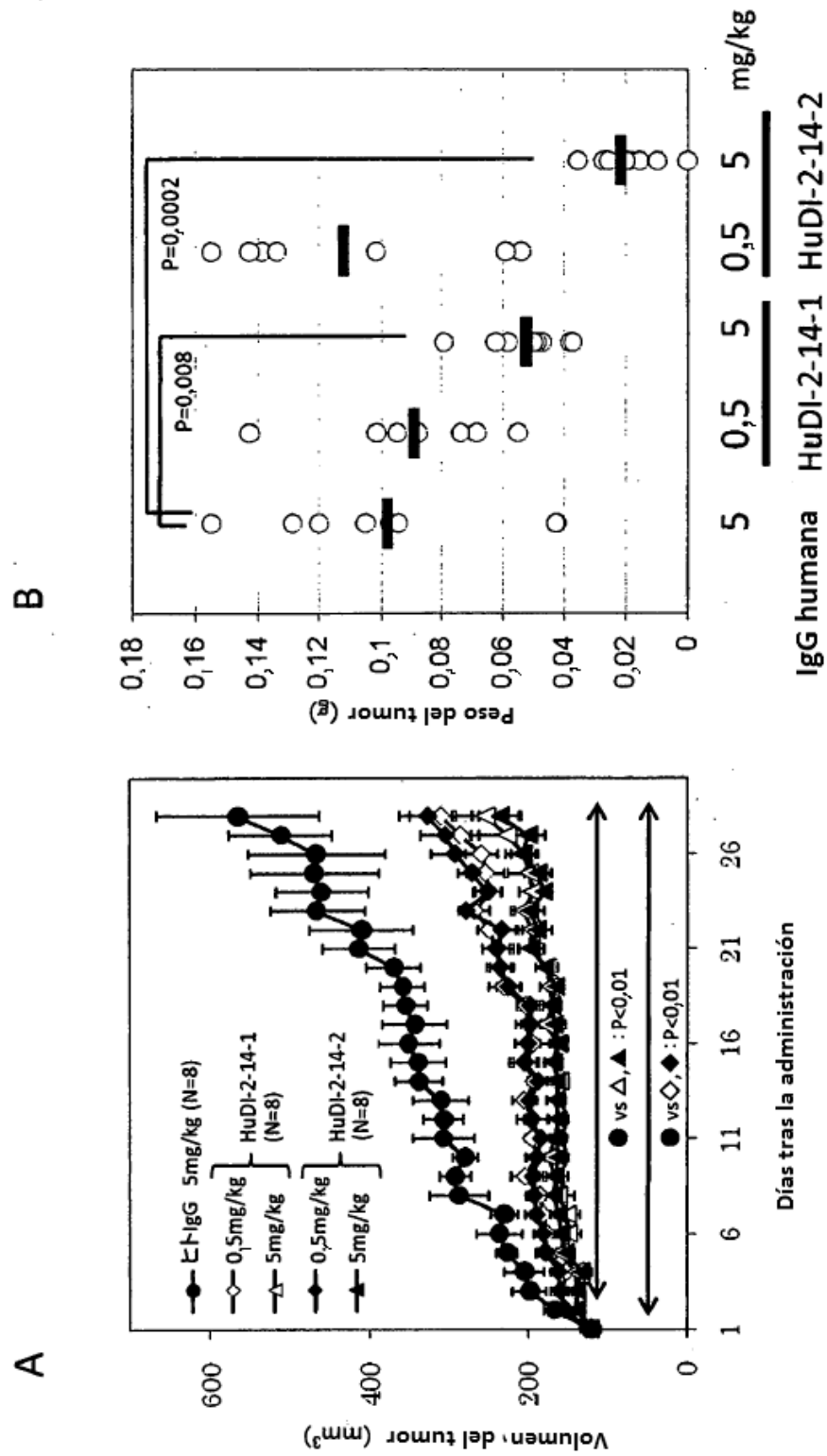


Fig. 43

