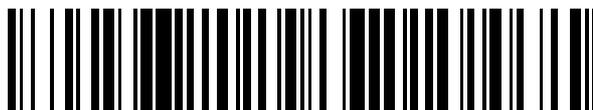


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 550 639**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/28** (2006.01) **C12R 1/91** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/02** (2006.01)  
**C07K 16/46** (2006.01)  
**G01N 33/53** (2006.01)  
**G01N 33/574** (2006.01)  
**G01N 33/577** (2006.01)  
**C12N 15/02** (2006.01)  
**C12N 15/09** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2010 E 10769764 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2015 EP 2426148**

54 Título: **Anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  para su utilización en el tratamiento de un tumor de la sangre**

30 Prioridad:

**27.04.2009 US 172923 P**

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

**11.11.2015**

73 Titular/es:

**KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)  
1-6-1, Ohtemachi Chiyoda-ku  
Tokyo 100-8185, JP**

72 Inventor/es:

**TAWARA, TOMONORI;  
TAKAYANAGI, SHINICHIRO y  
INAGAKI, YOSHIMASA**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

ES 2 550 639 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

Anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  para su utilización en el tratamiento de un tumor de la sangre.

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un anticuerpo contra la proteína IL-3R $\alpha$  humana (por otro nombre: CD123 humana). También se describen en la presente memoria un agente terapéutico y un agente de diagnóstico para tumores malignos mielocíticos, particularmente leucemia mieloide aguda (AML), que comprende como principio activo un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana.

### **Antecedentes de la invención**

#### Con respecto a tumor maligno:

Un tumor maligno (cáncer) es la primera causa principal de muerte en Japón, y el número de pacientes crece cada año, y se desea vivamente el desarrollo de un fármaco y un método terapéutico que tenga eficacia y seguridad elevadas. Como la causa que forma un tumor maligno, están una mutación del ADN por radiación, rayos ultravioletas y diversas sustancias carcinogénicas. Los estudios sobre tumores malignos se han centrado en la identificación biológica molecular de estos cambios genéticos. Como resultado, se considera que la transformación tumorigénica es inducida por la acumulación de un gran número de mutaciones, y similares. Se ha demostrado mediante un modelo de estirpe celular y similar que algunas mutaciones decisivas están conectadas directamente con la transformación tumorigénica. Con respecto a la leucemia como una de las enfermedades diana de la invención, se han identificado y clasificado muchas anomalías cromosómicas. En muchos de los casos, se encuentra translocación del cromosoma, y en las principales translocaciones cromosómicas ya se han identificado algunos genes asociados con la translocación cromosómica. Analizando las funciones de los genes relacionados con la translocación, se ha encontrado que estos genes están implicados en el inicio de la leucemia.

#### Con respecto a las células troncales cancerosas:

Por otro lado, desde hace tiempo, desde el punto de vista de la biología celular, se ha propuesto la denominada hipótesis de células troncales cancerosas, que señala que la célula troncal es el origen de un tumor maligno similar al tejido normal. La célula troncal se define como una célula que tiene capacidad de replicación autónoma y pluripotencia, y generalmente se divide aproximadamente en célula troncal totipotente y célula troncal tisular. Las células troncales tisulares se originan a partir de tejidos y órganos específicos tales como el sistema sanguíneo, hígado, sistema nervioso, y similar, y presentan una frecuencia extremadamente baja. Entre ellas, se ha estudiado muy frecuentemente la célula troncal hematopoyética. Se ha dado a conocer que un sistema hematopoyético se puede reconstruir durante un período de tiempo prolongado transplantando una célula troncal hematopoyética en un ratón en el que se destruyó el sistema hematopoyético mediante una dosis letal de irradiación (documento 1 no de patente). A diferencia de la célula troncal normal, los estudios sobre células troncales cancerosas se han retrasado durante un período de tiempo prolongado puesto que no se pudo encontrar su naturaleza exacta. Sin embargo, se ha identificado por primera vez una célula troncal cancerosa en leucemia mieloide aguda, en 1997 por Dick et al. Después, se ha dado a conocer la presencia de células troncales cancerosas en diversos tumores malignos. Resumiendo, las células troncales cancerosas están presentes a una frecuencia de varios % o menos de todas las células troncales tanto tumorales y raras como normales. Se considera que las células restantes que forman el tumor son células precursoras tumorales en las que la capacidad de proliferación está limitada, o células tumorales.

Mediante estos informes, se mostró que existe una jerarquía incluso en el tumor similar al tejido normal, y la célula troncal cancerosa que reside en este pico (origen) tiene una fuerte capacidad formadora de tumores.

#### Características y problemas terapéuticos de células troncales cancerosas:

Resumiendo muchos informes, se considera que las células troncales cancerosas mantienen diversas características que poseen las células troncales normales. Los ejemplos de similitudes incluyen la rareza de las células, un microentorno (nicho) en el que existe la célula, la expresión de un gen de multirresistencia, la detención del ciclo celular, y similares.

Particularmente, las características de que expresan un grupo de genes de multirresistencia y de que están en la interfase del ciclo celular similar a células troncales normales podría convertirse en un problema terapéuticamente enorme. Un gen de multirresistencia BCRP es una bomba que afecta a la eficacia del fármaco al eliminar diversos agentes antitumorales fuera de las células, y se ha dado a conocer un método para recoger células troncales haciendo uso de la actividad (documento 2 no de patente). Además, su presencia en la interfase del ciclo celular bajo el estado de "detención" (documento 3 no de patente) provoca una reducción de la sensibilidad a muchos agentes antitumorales y radiaciones que atacan el crecimiento celular rápido del cáncer (documentos 4 y 5 no de patente).

Basándose en las características anteriores, se considera que la célula troncal cancerosa que presenta resistencia a la terapia es una causa de regeneración tumoral.

#### Con respecto al fármaco diana molecular

Las tres vías principales de tratamiento de un tumor maligno incluyen la terapia con agentes antitumorales, la terapia de radiación y la extirpación quirúrgica. El tumor de la sangre está limitado a la terapia con agentes antitumorales y a la terapia de radiación, y como se describe en lo anterior, la célula troncal cancerosa puede tener una resistencia a estos tratamientos. Otro problema es que los efectos secundarios son grandes, puesto que estos dos tratamientos afectan a todo el cuerpo. Como medio para resolver este problema, es de esperar un fármaco diana molecular. Tienen la posibilidad de reducir los efectos secundarios al presentar su eficacia farmacéutica solamente en la célula que expresa la molécula diana.

Los ejemplos de fármacos típicos del fármaco diana molecular en el campo de enfermedades sanguíneas incluyen imatinib y rituximab. Imatinib se dirige contra un factor que provoca la leucemia, denominado Bcr-Abl, producido por una anomalía cromosómica (cromosoma de Filadelfia), que se observa en el 95% de los pacientes con CML. Este es un fármaco de bajo peso molecular que induce el suicidio de células leucémicas al inhibir la función de Bcr-Abl. Rituximab es un anticuerpo terapéutico que reconoce CD20 como una molécula de la superficie en una célula B, y tiene un efecto antitumoral sobre un tumor maligno de célula B (linfoma no de Hodgkin y similar). Por otro lado, los fármacos diana moleculares para AML son pocos, y solamente hay un agente gemtuzumabozogamicina (Mylotarg) en el que un antibiótico, calicheamicina, está enlazado a un anticuerpo monoclonal para CD33, conocido como un antígeno de la superficie celular de AML. Sin embargo, actualmente el uso de Mylotarg está limitado debido a su fuerte toxicidad, que se considera derivada de la calicheamicina, además del problema de que el intervalo terapéutico es estrecho. Basándose en lo expuesto anteriormente, se puede afirmar que el descubrimiento de un nuevo gen diana y el desarrollo de un agente terapéutico para éste son invenciones importantes que conducen directamente a la posibilidad de terapia y expansión de las elecciones de la terapia.

Como la realización de fármacos diana moleculares, se han estudiado y desarrollado diversas sustancias tales como un anticuerpo terapéutico y un fármaco de bajo peso molecular, así como un fármaco peptídico, una preparación proteica biológica tal como citocina, un ARNpi, aptámero, y similar. Cuando se usa un anticuerpo como agente terapéutico, debido a su especificidad, es útil en el tratamiento de patologías en las que la célula trastornada expresa un antígeno específico. El anticuerpo se une a una proteína que se expresa sobre la superficie celular como su antígeno, y actúa eficazmente al unirse a la célula. El anticuerpo tiene una característica de una semivida prolongada en la sangre y una elevada especificidad por su antígeno, y también es notablemente útil como agente antitumoral. Por ejemplo, cuando un anticuerpo se dirige a un antígeno específico de tumor, se puede esperar que el anticuerpo administrado se acumule en el tumor y ataque de ese modo a la célula tumoral vía la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Además, al unir una sustancia radioactiva, una sustancia citotóxica y similar a un anticuerpo, es posible transferir eficientemente un agente a la parte tumoral y permitir de ese modo que actúe sobre ella. Al mismo tiempo, puede disminuir la cantidad del agente dirigido a otros tejidos no específicos, y también se puede esperar una reducción de efectos secundarios. Se puede esperar la inhibición del crecimiento tumoral o la regresión del tumor al administrar un anticuerpo que tiene actividad agonista cuando un antígeno específico de tumor tiene una actividad para inducir la muerte celular, o al administrar un anticuerpo que tiene actividad de neutralización cuando un antígeno específico de tumor está relacionado con el crecimiento y supervivencia de las células. Debido a las características anteriores, se considera que los anticuerpos son adecuados en la aplicación como agentes antitumorales.

#### Con respecto a los anticuerpos terapéuticos:

En la preparación de anticuerpo original, se usó un ratón como el animal a inmunizar. Sin embargo, el uso de anticuerpos de ratón como fármacos está limitado debido a un gran número de razones. Un anticuerpo de ratón puede ser reconocido como una sustancia extraña en el cuerpo humano, induciendo la denominada respuesta de "anticuerpo anti-ratón humano", a saber, "HAMA" (documento 6 no de patente). Además, la región Fc del anticuerpo de ratón no es eficaz para el ataque sobre células enfermas vía el complemento humano o células inmunitarias humanas.

Como uno de los enfoques para evitar tales problemas, se ha desarrollado un anticuerpo quimérico (documentos 1 y 2 de patente). El anticuerpo quimérico contiene partes de anticuerpos derivadas de dos o más especies (región variable de anticuerpo de ratón, región constante de anticuerpo humano, y similar). Un punto ventajoso de tal anticuerpo quimérico es que mantiene las características del anticuerpo de ratón pero puede activar el complemento humano o células inmunitarias humanas, ya que tiene Fc humana. Sin embargo, es conocido que tal anticuerpo quimérico todavía induce la respuesta de "anticuerpo humano anti-quimérico", a saber, "HACA" (documento 7 no de patente).

Además, se ha desarrollado un anticuerpo recombinante en el que solamente se sustituyeron las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de una parte de un anticuerpo (documentos 3 y 4 de patente).

Mediante el uso de una técnica de injerto de CDR, se obtiene un anticuerpo que comprende una CDR de ratón y una región estructural variable humana y una región constante humana, el denominado "anticuerpo humanizado" (documento 8 no de patente). Además, mediante el uso de un ratón productor de anticuerpo humano, o mediante la identificación usando una biblioteca de anticuerpos humanos, se han proporcionado técnicas ampliamente utilizadas también relacionadas con la preparación de anticuerpos humanos completos (documentos 9 y 10 no de patente).

Con respecto a IL-3R $\alpha$ :

La IL-3R $\alpha$  es la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-3, pertenece a una familia de receptores de citocinas, y muestra una afinidad débil por IL-3 como su ligando. Al formar un heterorreceptor con su cadena  $\beta$  (CD131, en lo sucesivo denominado también como IL-3R $\beta$ ), un receptor de IL-3 tiene una fuerte afinidad y transfiere una señal, tal como crecimiento, diferenciación y similar, a una célula a través de la región intracelular de la cadena  $\beta$ . La cadena  $\alpha$  del receptor de IL-5 y la cadena  $\alpha$  del receptor de GM-CSF comparten en común la cadena  $\beta$ .

La IL-3R $\alpha$  es una proteína membránica de tipo I de transmembrana de un solo paso, y se sabe, en base a la secuencia, que en la región extramembránica están presentes un sitio de unión a IL-3 y un sitio de fibronectina tipo III. Se sabe que no hay ninguna estructura que pueda transferir una señal en la región intramembránica. Aunque la estructura tridimensional de IL-3R $\alpha$  no se ha analizado todavía, se puede suponer que las estructuras de receptores de citocinas son similares entre familias, puesto que la posición del resto de cisteína que forma el enlace S-S estructuralmente importante está conservada en la mayoría de los casos. Entre los mismos receptores de citocinas, se han analizado las estructuras cristalinas de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-13, de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4, y de la cadena  $\alpha$  del receptor de GM-CSF. Basándose en la información de estas familias de receptores de citocinas, se puede suponer que la región extramembránica de IL-3R $\alpha$  está aproximadamente dividida en 3 dominios (dominios A-B-C). Se sabe que un anticuerpo 7G3 que reconoce el dominio A de IL-3R $\alpha$  humana bloquea la señalización de IL-3 (documento 11 no de patente). Además, se ha dado a conocer la expresión de una molécula de IL-3R $\alpha$  deficiente en el dominio A (documento 12 no de patente), y como cuestión de rutina, un anticuerpo que reconoce el dominio A no puede reconocer IL-3R $\alpha$  deficiente en el dominio A. Además, se considera que el dominio C es la raíz de la molécula de IL-3R $\alpha$ , y tiene una elevada posibilidad de inhibir tridimensionalmente la asociación de IL-3R $\beta$  con IL-3R $\alpha$ .

La IL-3 es el único ligando que se conoce como ligando de IL-3R $\alpha$ . IL-3 es un factor hematopoyético que se sabe que acelera la formación de colonias de los siguientes: eritrocito, megacariocito, neutrófilo, eosinófilo, basófilo, mastocito y célula del sistema monocítico. Se sabe que IL-3 también estimula una célula precursora que tiene pluripotencia, pero se afirma bastante que IL-3 acelera una diferenciación no de una célula troncal inmadura que tiene capacidad de replicación autónoma sino de una célula precursora comprometida con la diferenciación.

Es conocido que IL-3R $\alpha$  está relacionada con el crecimiento y diferenciación de células mieloides al formar un heterodímero con la cadena  $\beta$  y transferir de ese modo la señalización de IL-3 a la célula vía la ruta de fosforilación de serina/treonina. Se sabe que IL-3R $\alpha$  está expresada en células progenitoras de granulocitos-macrófagos (GMP) o células progenitoras mieloides comunes (CMP) entre las células precursoras hematopoyéticas, e induce crecimiento y diferenciación en sistemas de neutrófilos y macrófagos vía la señalización de IL-3. Por otro lado, se ha dado a conocer que el progenitor megacariocítico-eritroide (MEP) que se presenta aguas abajo de CMP no expresa IL-3R $\alpha$ , a diferencia del GMP, que también está presente aguas abajo.

Con respecto a células troncales de AML, Bonnet y Dick han dado a conocer que la célula troncal de AML está presente en la fracción CD34 positiva CD38 negativa (referencia 13 no de patente). Además, comparando la misma fracción (CD34 positiva CD38 negativa) de la célula troncal normal, Jordan et al. han encontrado que IL-3R $\alpha$  está muy expresada en la célula troncal de AML (referencia 14 no de patente). En la pluralidad de informes posteriores (referencias 15 y 16 no de patente) también se ha dado a conocer un elevado potencial de IL-3R $\alpha$  como marcador de no solo la célula troncal de AML sino también de célula troncal de leucemia. En el tratamiento de cánceres que incluyen leucemia, es importante que se eliminen solamente las células cancerosas sin lesionar tanto como sea posible células normales, y se considera que esta diferencia en la expresión de IL-3R $\alpha$  entre la célula troncal normal y la célula troncal leucémica es útil en el tratamiento dirigido a la célula troncal leucémica.

Con respecto a IL-3R $\beta$  que forma un heterodímero con IL-3R $\alpha$ , no hay ningún informe que afirme que IL-3R $\beta$  está muy expresada en células troncales de leucemia, y también en el caso de una micromatriz en la que se compara de hecho la expresión de ARNm en célula troncal de leucemia y célula troncal normal, IL-3R $\beta$  no está identificada como una molécula en la que su expresión está incrementada en célula troncal de leucemia (referencia 17 no de patente).

Con respecto a IL-3R $\beta$  que forma un heterodímero con IL-3R $\alpha$ , no hay ningún informe que afirme que IL-3R $\beta$  está muy expresada en célula troncal de leucemia, y también en el caso de una micromatriz en la que se compara de hecho la expresión de ARNm en célula troncal de leucemia y célula troncal normal, IL-3R $\beta$  no se identifica como una molécula cuya expresión está incrementada en célula troncal de leucemia (referencia 18 no de patente).

La presencia de una célula leucémica que depende de IL-3 es conocida desde hace tiempo, y los estudios antiguos son estudios enfocados en un blastocito, que ocupa la mayoría de las células leucémicas. Según los estudios recientes sobre célula troncal leucémica, se afirma que la célula troncal leucémica adquiere resistencia a agentes antitumorales al suprimir exhaustivamente su crecimiento. Además, se considera que un blastocito reactivo con IL-3 tiene una capacidad de proliferación elevada, de manera que se supone que tal célula es eficaz en el tratamiento general usando un agente antitumoral.

Como candidato del agente dirigido a un receptor de IL-3R, la propia IL-3 se administró durante mucho tiempo a pacientes con insuficiencia hematopoyética, pero no dio resultado como fármaco. Está en desarrollo un ensayo clínico para una proteína de fusión en la que se añade la toxina diftérica a IL-3, apuntando a la leucemia como una diana de la enfermedad. Con respecto a la IL-3 y la fusión de toxina diftérica-IL-3, éstas no son adecuadas como los agentes dirigidos contra células en las que la expresión de IL-3R $\alpha$  está incrementada específicamente, puesto que IL-3 se une fuertemente no a una proteína de IL-3R $\alpha$  sola sino también a una heteroproteína de IL-3R $\alpha$  y  $\beta$ , debido a las propiedades de IL-3. Por otro lado, como candidato de un agente dirigido contra IL-3R $\alpha$ , se ha dado a conocer un resultado de primera fase de un anticuerpo quimérico 7G3 de ratón y humano anti-IL-3R $\alpha$  (documento 19 no de patente). Puesto que el anticuerpo quimérico 7G3 se usa con el objeto de bloquear la señalización de IL-3 como mecanismo de terapia contra AML, éste no es un agente dirigido a eliminar células positivas para IL-3R $\alpha$ . También, aunque se conocen algunos otros anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  (9F5 (Becton Dickinson), 6H6 (SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY) y AC 145 (Miltenyi-Biotech)), éstos no tienen la capacidad para eliminar las células que expresan de forma elevada IL-3R $\alpha$ .

El documento 20 no de patente describe el anticuerpo monoclonal 7G3, que se une específicamente a la cadena de IL-3R $\alpha$ . El documento 5 de patente describe un anticuerpo monoclonal anti-cadena de IL-3R $\alpha$  producido mediante la estirpe celular de hibridoma designada 7G3. El documento 21 no de patente da a conocer un estudio de fase I que usa CSL360, un mAb IgG1 quimérico recombinante derivado de 7G3.

#### Listado de citas

##### Documento de patente

Documento 1 de patente: Solicitud de Patente Publicada EP 120694

Documento 2 de patente: Solicitud de Patente Publicada nº 125023

Documento 3 de patente: Solicitud de Patente GB nº GB2188638A

Documento 4 de patente: patente US nº 5.585.089

Documento 5 de patente: WO 97/24373

##### Documento no de patente

Documento 1 no de patente: Osawa M et al., Science. 273:2 42-5 (1996)

Documento 2 no de patente: Goodell MA et al., J Exp Med. 183: 1797-806 (1996)

Documento 3 no de patente: Yamazaki S et al., EMBO J. 25: 3515-23 (2006)

Documento 4 no de patente: Ishikawa F et al., Nat Biotechnol. 25:1315-21. (2007)

Documento 5 no de patente: Bao S et al., Nature. 444: 756-60 (2006)

Documento 6 no de patente: Schiff et al., Canc. Res., 45, 879-885 (1985)

Documento 7 no de patente: Bruggemann et al., J. Exp. Med., 170:2153-2157 (1989)

Documento 8 no de patente: Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988)

Documento 9 no de patente: Ishida I et al., Cloning Stem Cells. 4:91-102 (2002)

Documento 10 no de patente: Wu et al., J Mol Biol. 19:151-62 (1999)

Documento 11 no de patente: Sun et al., Blood, 87:83 (1996)

Documento 12 no de patente: Chen et al., J Biol Chem, 284: 5763(2009)

Documento 13 no de patente: Bonnet et al., Nat Med, 1997; 3: 730

Documento 14 no de patente: Jordan et al., Leukemia, 2000; 14: 1777

Documento 15 no de patente: Haematologica, 2001; 86:1261

Documento 16 no de patente: LeukLymphoma, 2006; 47:207

Documento 17 no de patente: Majeti et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106:3396

Documento 18 no de patente: Majeti et al., Proc Natl Acad Sci USA. 106:3396(2009)

Documento 19 no de patente: Blood, 2008 112 (11): Abstract 2956

Documento 20 no de patente: Sun et al (1996) Blood 87:83-92

Documento 21 no de patente: Roberts et al (2008) Blood 112:1015-1016

## Sumario de la invención

### Problemas técnicos

Un objetivo de la invención es proporcionar un agente terapéutico que puede eliminar células troncales leucémicas solas y que también apenas presente efectos adversos sobre células normales (muestra muy pocos efectos secundarios). Específicamente, la presente invención proporciona un anticuerpo contra la cadena de IL-3R $\alpha$  humana, que no inhibe la señalización de IL-3, y que se une al dominio B de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana pero no se une al dominio C. También se describe en la presente memoria una composición que comprende el anticuerpo, y un método terapéutico o método de detección que comprende el anticuerpo.

### Solución de problemas

La invención se refiere a los siguientes (1) a (9).

- (1) Un anticuerpo contra una cadena de IL-3R $\alpha$  humana, que no inhibe la señalización de IL-3 que se une al dominio B de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana pero no se une al dominio C de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana.
- (2) El anticuerpo descrito en el (1) mencionado anteriormente, que tiene además citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) elevada.
- (3) El anticuerpo descrito en el (1) o (2) mencionado anteriormente, en el que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) elevada muestra una tasa de lisis específica de 10% a una concentración de anticuerpo de 0,01  $\mu$ g/ml, mediante un método de ensayo de ADCC sobre células Colon-26/hCD123 que usa PBMC cultivadas con IL-2.
- (4) El anticuerpo descrito en uno cualquiera de los (1) a (3) mencionados anteriormente, que comprende secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e):
  - (a) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 113 a 115, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 131 a 133, respectivamente,
  - (b) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 116 a 118, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 134 a 136, respectivamente,
  - (c) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID NOs: 119 a 121, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 137 a 139, respectivamente,
  - (d) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 122 a 124, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 140 a 142, respectivamente,

(e) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 125 a 127, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 143 a 145, respectivamente.

5 (5) El anticuerpo descrito en uno cualquiera de los (1) a (4) mencionados anteriormente, que comprende la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e):

10 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 53, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de valina (V) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 55;

15 (b) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 57, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de valina (V) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 59;

20 (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 61, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 63;

25 (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 65, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 67; y

30 (e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 138 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 69, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 71.

35 (6) Una composición para uso en un método para prevenir o tratar un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-3R $\alpha$  se encuentra en la médula ósea o sangre periférica de un sujeto, que comprende el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  descrito en uno cualquiera de (1) a (5) como principio activo.

40 (7) El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  descrito en uno cualquiera de (1) a (5) para uso en un método para tratar un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-3R $\alpha$  se encuentra en médula ósea o sangre periférica.

45 (8) Uso del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  descrito en uno cualquiera de (1) a (5) para detectar un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-3R $\alpha$  se encuentra en médula ósea o sangre periférica de una muestra biológica procedente de un sujeto.

50 (9) La composición para uso como se describe en (6) o el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  para uso como se describe en (7) o el uso como se describe en (8), en el que el tumor de la sangre es leucemia mieloide aguda (AML).

### 50 Efecto ventajoso de la invención

La invención se refiere a un anticuerpo contra la cadena de IL-3R $\alpha$  humana, que no inhibe la señalización de IL-3 y que se une al dominio B de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana pero que no se une al dominio C; a una composición que comprende dicho anticuerpo; y a un método terapéutico o método de detección que usa dicho anticuerpo.

### Breve descripción de los dibujos

60 [Figura 1] y [figura 2] Las figuras 1 y 2 son resultados de un análisis de citometría de flujo de una célula que expresa una proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$  usando un anticuerpo marcado anti-IL-3R $\alpha$ .

[Figura 3] La figura 3 es un resultado de un análisis de citometría de flujo de una célula que expresa una proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$  usando un anticuerpo marcado anti-IL-3R $\alpha$ .

65 [Figura 4] La figura 4 es una gráfica en la que, entre las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos de los dominios

A y B de la molécula de IL-3R $\alpha$  humana, se muestran mediante líneas discontinuas partes de regiones en las que las regiones 1 a 7 dispuestas en el exterior de la molécula están sustituidas por la secuencia de GM-CSFR $\alpha$  mostrada.

5 [Figura 5] La figura 5 es un resultado de un ensayo de crecimiento celular para examinar la actividad de bloqueo de la señalización de IL-3. La ordenada representa el porcentaje de inhibición de crecimiento celular (%) y la abscisa representa diversos nombres de anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ .

10 [Figura 6] La figura 6 es un resultado de un ensayo de colonias para examinar la actividad de bloqueo de la señalización de IL-3. GM, E, y GEMM muestran resultados usando el sistema de granulocitos/macrófagos, colonia del sistema de eritroides, y colonias mixtas, respectivamente.

15 [Figura 7] La figura 7 es un resultado de examinar los efectos antitumorales de diversos anticuerpos humanos en un modelo que posee tumor. La ordenada representa el número de células MOLM13, y la abscisa representa los diversos nombres de anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ .

20 [Figura 8] y [figura 9] Las figuras 8 y 9 son resultados del ensayo de ADCC para estirpes celulares que expresan IL-3R $\alpha$  usando anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ . En la figura 8 se usó PBMC no cultivada con IL-2, y en la figura 9 se usó PBMC cultivada con IL-2.

25 [Figura 10] La figura 10 es un resultado del análisis de citometría de flujo de células que expresan una IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis* mediante el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  y un anticuerpo secundario anti-IgG humana marcado con PE. La columna superior muestra las células que expresan IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis*, y la columna inferior muestra las células que expresan IL-3R $\alpha$  humana.

#### **Modo de poner en práctica la invención**

(Descripción detallada de las formas de realización deseables especificadas)

30 Los encabezamientos de las secciones a usar en esta memoria descriptiva son solamente con el fin de organización, y no se deberían de interpretar como limitación para el objeto principal a describir.

#### (Resumen)

35 Esta invención se refiere a un anticuerpo contra la cadena de IL-3R $\alpha$  humana, que no inhibe la señalización de IL-3, y que se une al dominio B de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana (en adelante denominada IL-3R $\alpha$ ) pero que no se une al dominio C.

40 Los receptores de IL-3 (en adelante denominados IL-3R), particularmente IL-3R $\alpha$ , son expresados en la superficie celular de una célula troncal leucémica. En general, la cadena  $\beta$  del receptor de IL-3 (en adelante denominada IL-3R $\beta$ ) transfiere la señalización de IL-3 a la célula, y por lo tanto induce crecimiento y diferenciación.

45 En consecuencia, existe la posibilidad de que una inhibición de la señalización de IL-3 provoque efectos secundarios tales como la inhibición de la acción hematopoyética normal por una célula troncal normal. De este modo, como nuevo método terapéutico dirigido a la célula troncal leucémica, es preferible que el método se dirija contra IL-3R $\alpha$  y que no inhiba la señalización de IL-3.

#### (IL-3R $\alpha$ )

50 El gen de IL-3R $\alpha$  es una proteína transmembránica de tipo I que pertenece a una familia de receptores de citocinas. En células normales, la molécula de IL-3R $\alpha$  es expresada sobre una parte de células precursoras hematopoyéticas, basófilos, una parte de células dendríticas, y similares. En el caso de tumores, se sabe que es expresada en un cáncer y leucemia en el sistema hematopoyético. Como ejemplos de tumores que expresan IL-3R $\alpha$ , se sabe que IL-3R $\alpha$  es expresada en blastocitos de AML y CML en la fase de crisis blástica, y en el caso de una fracción negativa para marcadores de diferenciación positiva para CD34 negativa para CD38 considerada como una célula troncal leucémica, en AML, CML, MDS, ALL y SM. En la sangre, IL-3, que es un ligando conocido de IL-3R $\alpha$ , es expresada sobre una célula T activada, una célula asesina natural, un mastocito y una parte de células del sistema megacariocítico. Además, la IL-3R $\alpha$  también se denomina CD123. La IL-3R $\alpha$  incluye una IL-3R $\alpha$  de tipo mamífero (por ejemplo, los primates y humanos). La secuencia de IL-3R $\alpha$  incluye variantes polimórficas. Los ejemplos  
60 específicos de la IL-3R $\alpha$  humana de longitud completa incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos.

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVKD  
 ADYSMPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAENL  
 TCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQGTRIG  
 CRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKCNKTHS  
 FMHWKMRSHFNRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTV  
 QIRARERVYEFLSAWSTPQRFECQEEGANTRAWRTSLLLIALGTLLALVCVVIC  
 RRYLVMQRLFPRIPIHMKDPIGDSFQNDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

(SEC ID NO: 1)

5 Los ejemplos específicos de secuencia de aminoácidos de la región extracelular de IL-3R $\alpha$  humana incluyen las siguientes secuencias de aminoácidos:

MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQQLTWDLNRNVTDIECVK  
 DADYSMPAVNNSYCQFGAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGAE  
 NLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNVANRRQQYECLHYKTDAQG  
 TRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFIPCTDKFVVFSQIEILTPPNMTAKC  
 NKTHSFMHWKMRSHFNRKFRYELQIQKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTV  
 QIRARERVYEFLSAWSTPQRFECQEEGANTRAWRTSL (SEQ ID NO:2)

10 Además, la región extracelular de IL-3R $\alpha$  está dividida en tres dominios de A a C.

15 Un dominio comprende una región desde glutamina (Q) en la posición 18 hasta serina (S) en la posición 100 en los aminoácidos de SEC ID NO: 2, y el dominio B comprende desde la glicina (G) en la posición 101 hasta serina (S) en la posición 203 en los aminoácidos de SEC ID NO: 2, y el dominio C, aquella desde la glutamina (Q) en la posición 204 a leucina (L) en la posición 308 en los aminoácidos de SEC ID NO: 2.

Además, en el dominio A y en el dominio B, las siguientes 7 regiones están dispuestas en el exterior de la molécula.

20 La región 1 es desde el ácido aspártico (D) en la posición 55 hasta prolina (P) en la posición 61 en los aminoácidos de la SEC ID NO: 2, la región 2 es desde la valina (V) en la posición 63 hasta fenilalanina (F) en la posición 70 en los aminoácidos de la SEC ID NO:2, la región 3 es desde la serina (S) en la posición 91 hasta ácido glutámico (E) en la posición 98 en los aminoácidos de la SEC ID NO: 2, la región 4 es desde la prolina (P) en la posición 97 hasta triptófano (W) en la posición 104 en los aminoácidos de la SEC ID NO:2, la región 5 es desde la cisteína (C) en la posición 122 hasta prolina (P) en la posición 128 en los aminoácidos de la SEC ID NO:2, la región 6 es desde la isoleucina (I) en la posición 182 hasta serina (S) en la posición 188 en los aminoácidos de la SEC ID NO: 2, y la región 7 es desde la glicina (G) en la posición 192 hasta lisina (K) en la posición 198 en los aminoácidos de la SEC ID NO:2.

30 En consecuencia, los ejemplos del anticuerpo de la invención incluyen un anticuerpo que se une a una secuencia de aminoácidos de las posiciones 101 a 203 en los aminoácidos de SEC ID NO: 2 que es la región extracelular de IL-3R $\alpha$ , pero que no se une a una secuencia de aminoácidos de posiciones 204 a 308, y un anticuerpo que se une además a secuencias de aminoácidos de posiciones 182 a 188 y posiciones 192 a 198 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 2.

35 El anticuerpo de la invención se une a las regiones específicas mencionadas anteriormente de la región extracelular de IL-3R $\alpha$ , y no inhibe la señalización de IL-3.

40 La expresión "no inhibe la señalización de IL-3", como se usa en la invención, significa que no inhibe la señal intracelular a través de IL-3R mediante IL-3, e incluye un caso en el que la asociación de IL-3 con IL-3R no está inhibida y la unión de la cadena de IL-3R $\alpha$  y la cadena  $\beta$  no está inhibida. Específicamente, significa que la relación de inhibición del crecimiento celular mostrada por figura 5 según el análisis en el ejemplo 8 es 40% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 80% o más, cuando la concentración de anticuerpo se ajusta a 10  $\mu$ g/ml. Según esta memoria descriptiva, las expresiones "bloquear la señalización de IL-3" e "inhibir la señalización de IL-3" se usan con el mismo significado y no son discriminantes, y la actividad de bloqueo de la señalización de IL-3 significa la capacidad para inhibir la señalización de IL-3.

45 También, el anticuerpo de la invención tiene una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC) elevada, además de las propiedades mencionadas anteriormente.

50

El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que tiene actividad de ADCC significa un anticuerpo que se une a una célula que expresa IL-3R $\alpha$  para exterminar a la célula que expresa IL-3R $\alpha$  vía una célula efectora que tiene citotoxicidad, tal como célula NK y similar.

5 La actividad de ADCC elevada significa que el porcentaje de lisis específico es 10% o más a una concentración de anticuerpo de 0,01  $\mu$ g/ml o menos cuando se mide mediante un ensayo de ADCC sobre células Colon-26/hCD123 que usa PBMC cultivada con IL-2.

10 El porcentaje de lisis específica significa un valor obtenido midiendo el porcentaje de lisis de una célula diana por un anticuerpo, y se puede calcular específicamente según el siguiente ejemplo 11.

15 Los ejemplos de la célula que expresan IL-3R $\alpha$  incluyen células cancerosas de la sangre (células de leucemia mieloide aguda (AML), células de leucemia mieloide crónica (CML), células de síndromes mielodisplásicos (MDS), células de leucemia linfóide aguda (ALL), células de leucemia linfóide crónica (CLL), células de mieloma múltiple (mieloma múltiple: MM), células de mastocitoma sistémico (SM), etc.), células T reguladoras (tales como células CD4-positivas CD25-positivas), células presentadoras de antígeno (tales como células dendríticas, monocitos, macrófagos y células similares a ellas (células estrelladas hepáticas, osteoclastos, microglíocitos, las células fagocíticas epidérmicas principales, células del polvo (macrófagos alveolares), etc.)), basófilos, y similares.

20 Además, la célula de AML, la célula de CML, la célula de ALL, la célula de CLL, la célula de MDS, la célula de SM, la célula de MM, diversas células de linfoma incluyen sus células troncales cancerosas.

25 La célula troncal cancerosa es uno de los grupos celulares que constituye el tumor. Por ejemplo, en leucemia mieloide aguda (AML) está representada por la célula mieloide Linaje(-)CD34(+)CD38(-). En consecuencia, puesto que el anticuerpo de la invención tiene actividad de ADCC elevada, induce reducción o eliminación de células que expresan IL-3R $\alpha$ .

30 También, el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de la invención incluye un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que tiene CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes (a) a (e):

(a) CDR 1 a 3 de cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 113 a 115, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 131 a 133, respectivamente,

35 (b) CDR 1 a 3 de cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 116 a 118, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 134 a 136, respectivamente,

40 (c) CDR 1 a 3 de cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 119 a 121, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 137 a 139, respectivamente,

45 (d) CDR 1 a 3 de cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 122 a 124, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 140 a 142, respectivamente, y

(e) CDR 1 a 3 de cadena pesada son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 125 a 127, respectivamente, y CDR 1 a 3 de cadena ligera son las secuencias de aminoácidos representadas por SEC ID NOs: 143 a 145, respectivamente.

50 Además, el anticuerpo de la invención incluye un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que comprende la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera seleccionadas del grupo que consiste en los siguientes (a) a (f) (se muestran entre paréntesis los nombres de los anticuerpos que se describen en los siguientes ejemplos a partir de los cuales se obtiene cada una de las regiones variables):

55 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde glutamina (Q) en la posición 20 hasta serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 53, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde valina (V) en la posición 23 hasta lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 55 (nombre del anticuerpo: Old4)

60 (b) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde glutamina (Q) en la posición 20 hasta serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 57, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde valina (V) en la posición 23 hasta lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos representada

65

por SEC ID NO: 59 (nombre del anticuerpo: Old5)

(c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde glutamina (Q) en la posición 20 hasta serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 61, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde ácido aspártico (D) en la posición 23 hasta lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 63 (nombre del anticuerpo: Old17)

(d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde glutamina (Q) en la posición 20 hasta serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 65, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde ácido aspártico (D) en la posición 23 hasta lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 67 (nombre del anticuerpo: Old19), y

(e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos desde glutamina (Q) en la posición 20 hasta serina (S) en la posición 138 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 69, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos desde ácido aspártico (D) en la posición 23 hasta lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID NO: 71 (nombre del anticuerpo: New102).

También se describen aquí anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  que comprenden una región variable de cadena pesada y/o una región variable de cadena ligera, que comprenden secuencias de aminoácidos en las que 1 a 3 restos de aminoácidos están suprimidos, sustituidos, añadidos o insertados en la región variable de cadena pesada y/o en la región variable de cadena ligera mostradas mediante (a) a (e).

(Anticuerpo)

El anticuerpo se usa en un sentido muy amplio, e incluye un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multivalente, un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico), y también fragmentos de anticuerpo en tanto que éstos presenten la actividad biológica deseada.

El anticuerpo contiene una secuencia de región variable de cadena pesada o de cadena ligera madura. Además, el anticuerpo también incluye una forma modificada y forma variante tal como sustituciones en o fuera de una región constante, una región determinante de la complementariedad (CDR) o un anticuerpo de región estructural (FR) de una secuencia de región variable de cadena pesada o ligera madura del anticuerpo, y similar. En una realización específica, la sustitución incluye una sustitución de aminoácidos conservativa incluida en la sustitución.

Además, el anticuerpo también incluye una subsecuencia de la secuencia de la región variable de cadena pesada o de cadena ligera madura. En una realización específica, la subsecuencia se selecciona de Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, Fv monocatenario (scFv), Fv de enlace de disulfuro (sdFv) y VL o VH.

Además, el anticuerpo también incluye un dominio heterogéneo. En una forma de realización específica, el dominio heterogéneo incluye una etiqueta, un marcador detectable o un agente citotóxico.

Los ejemplos del anticuerpo incluyen un anticuerpo monoclonal y un anticuerpo policlonal, y cualquier isotipo o subclase de los mismos. En una realización específica, el anticuerpo mencionado anteriormente es un isotipo de IgG (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4), IgA, IgM, IgE o IgD. El anticuerpo "monoclonal" significa un anticuerpo que se basa en, se obtiene de un único clon que incluye un clon eucariota, un clon procariota o un clon fágico, o que deriva de un único clon que incluye un clon eucariota, un clon procariota o un clon fágico, se basa en un único clon que incluye un clon eucariota, un clon procariota o un clon fágico. En consecuencia, el anticuerpo "monoclonal" es una sustancia estructuralmente definida, y no un método mediante el cual se produce.

El anticuerpo contra IL-3R $\alpha$ , anti-IL-3R $\alpha$  y anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  significan un anticuerpo que se une específicamente a IL-3R $\alpha$ . La unión específica significa que es selectiva para el epítipo que presenta una IL-3R $\alpha$ . La unión específica se puede distinguir de la unión no específica usando un ensayo conocido en el campo técnico (por ejemplo, inmunoprecipitación, ELISA, citometría de flujo, transferencia Western).

Cuando todos o una parte de los epítopos del antígeno a los que se une específicamente un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  están presentes en diferentes proteínas, existe la posibilidad de que este anticuerpo se pueda unir a las diferentes proteínas. Por lo tanto, existe la posibilidad de que el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  se una específicamente a otra proteína que tiene homología estructural o de secuencia elevada con el epítipo de IL-3R $\alpha$ , dependiendo de la homología estructural o de secuencia con el epítipo de IL-3R $\alpha$ . En consecuencia, existe la posibilidad de que el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  se una a una proteína diferente cuando un epítipo que tiene suficiente homología de secuencia o estructural está presente en la proteína diferente.

El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluye anticuerpos aislados y purificados. El anticuerpo de la invención, incluyendo un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  aislado o purificado, incluye un anticuerpo humano.

La expresión "(estar) aislada", que se debe utilizar como un modificador de una composición, significa que la composición se prepara por la mano del hombre o se separa de uno o más componentes adicionales en un entorno *in vivo* que se presenta en la naturaleza generalmente mediante una o más etapas o procedimientos de manipulación. En general, una composición separada de esta manera no contiene sustancialmente uno o más materiales con los que se asocian normalmente en la naturaleza, tal como una o más proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, hidratos de carbono y membranas celulares. Debido a esto, la composición aislada se separa de otros componentes biológicos en las células del organismo en las que aparece de forma natural en la composición, o del medio artificial en el que se produce (por ejemplo, mediante síntesis o cultivo celular). Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  aislado se puede obtener de un animal en el que se produce el anticuerpo (por ejemplo, mamíferos no transgénicos o mamíferos transgénicos (roedores (ratón) o los ungulados (ganado)) y se separa de otros polipéptidos y ácidos nucleicos. En consecuencia, se considera que el suero que contiene un anticuerpo obtenido de tal animal está aislado. La expresión "(estar) aislado" no excluye formas físicas alternativas, y por ejemplo, un anticuerpo aislado podría incluir subsecuencias y quimeras, multímeros o formas derivatizadas del anticuerpo.

La expresión "(estar) purificada", a usar como un modificador de una composición, se refiere a una composición que está libre de la mayoría de o de sustancialmente todos los materiales con los que está asociada en la naturaleza. En general, un anticuerpo purificado se obtiene a partir de los componentes que se presentan generalmente en el entorno del anticuerpo. Debido a esto, se considera que un sobrenadante de anticuerpo que se separa de una mezcla de cultivo celular de un hibridoma productor de anticuerpo está purificado. En consecuencia, el "(estar) purificado" no requiere pureza absoluta, y es específico del contexto. Además, la composición "(estar) purificada" se puede combinar con una o más moléculas adicionales. Debido a esto, la expresión "(estar) purificada" no excluye la combinación de composición. La pureza se puede determinar mediante un método apropiado opcional tal como espectrometría de UV, cromatografía (por ejemplo, HPLC, fase gaseosa), electroforesis en gel (por ejemplo, tinción con plata o Coomassie), análisis de secuencia (péptido y ácido nucleico) y similares.

La proteína y el ácido nucleico "purificados" incluyen una proteína y un ácido nucleico que se obtienen mediante un método de purificación estándar. También, una proteína y un ácido nucleico obtenidos mediante expresión recombinante en una célula hospedante y síntesis química también están incluidos en este término. Además, el "(estar) purificado" también se puede referir a una composición en la que el nivel de contaminantes es menor que el nivel que es aceptable por una agencia normativa para la administración a animales humanos o no humanos, tales como la Food and Drug Administration (FDA).

El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluye un anticuerpo que se une a IL-3R $\alpha$  y modula la función o actividad de IL-3R $\alpha$  *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, en un sujeto). En la memoria descriptiva, "modular" y sus variaciones gramaticales, cuando se usa en relación con la actividad o función de IL-3R $\alpha$ , significan que la actividad o función de IL-3R $\alpha$  está afectada, modificada o alterada de forma detectable, pero no incluye la inhibición de la señalización de IL-3. En consecuencia, el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que modula la actividad o función de IL-3R $\alpha$  es un anticuerpo que proporciona influencia, modificación o alteración de manera que una o más de la actividad o función de IL-3R $\alpha$  se puede detectar sin inhibir la señalización de IL-3, y tal actividad o función de IL-3R $\alpha$  puede incluir, por ejemplo, la unión de IL-3R $\alpha$  con un ligando de IL-3R $\alpha$  (por ejemplo, IL-3), una transferencia de señal mediada por IL-3R $\alpha$ , o una respuesta celular mediada por IL-3R $\alpha$  o una respuesta celular que puede ser modulada por IL-3R $\alpha$ , o la actividad o función de otra IL-3R $\alpha$  descrita en la memoria descriptiva, o en cualquier otra parte, es conocida normalmente o se puede conocer.

Los ejemplos de diversas actividades y funciones de IL-3R $\alpha$  no limitadas que se pueden modular incluyen la transducción de señales mediada por IL-3R $\alpha$  o la respuesta celular mediada por IL-3R $\alpha$ , la respuesta celular que se puede modular vía IL-3R $\alpha$ , la proliferación celular o expansión celular (por ejemplo, célula de AML, célula de CML, célula de ALL, célula de CLL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, diversas células de linfoma, monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos, células T cooperadoras, células T reguladoras, células asesinas naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), supervivencia o apoptosis celular (por ejemplo, célula de AML, célula de CML, célula de ALL, célula de CLL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, diversas células de linfoma, monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos, células T cooperadoras, células T reguladoras, células asesinas naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), expresión o producción de citocinas (por ejemplo, citocinas Th1, Th2 y no Th1/Th2) e interferones, expresión o producción de proteína antiapoptótica o proteína proapoptótica, tratamiento, supresión o mejora de trastorno, enfermedad, estado fisiológico, estado patológico y síntoma. Las citocinas específicas a modular no están limitadas, y los ejemplos incluyen IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-14, IL-16, IL-17, IL-23, IL-26, TNF- $\alpha$ , e interferón  $\gamma$  (*in vitro* o *in vivo*). Las proteínas antiapoptóticas y las proteínas proapoptóticas específicas no están limitadas, y los ejemplos incluyen Bcl-xL, Bcl-2, Bad, Bim, y Mcl-1.

Por lo tanto, los ejemplos de anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  descritos en la presente memoria descriptiva incluyen un anticuerpo que modula la transducción de señales mediada por IL-3R $\alpha$  o la respuesta celular mediada por IL-3R $\alpha$ , la

5 respuesta celular que puede ser modulada vía IL-3R $\alpha$ , la proliferación celular o crecimiento celular (por ejemplo, célula de AML, célula de CML, célula de ALL, célula de CLL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, diversas células de linfoma, monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos, células T cooperadoras, células T reguladoras, células asesinas naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), supervivencia o apoptosis celular (por ejemplo, célula de AML, célula de CML, célula de ALL, célula de CLL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, diversas células de linfoma, monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos, células T cooperadoras, células T reguladoras, células asesinas naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides), expresión o producción de citocinas (por ejemplo, citocinas Th1, Th2 y no Th1/Th2) e interferones, expresión o producción de proteína antiapoptótica o proteína proapoptótica, tratamiento, supresión o mejora de trastorno, enfermedad, estado fisiológico, estado patológico y síntoma. En las formas de realización específicas, el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de la presente invención puede modular la expansión o supervivencia de célula de AML, el número de otra célula cancerosa de la sangre (por ejemplo, célula de CML, célula de ALL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, diversas células de linfoma), el crecimiento o supervivencia de células sanguíneas no cancerosas tales como monocitos, macrófagos, mastocitos, basófilos, células T cooperadoras, células T reguladoras, células asesinas naturales, células progenitoras mieloides y células progenitoras linfoides, y reduce, hace desaparecer o agota célula de AML, célula de CML, célula de ALL, célula de CLL, célula de MDS, célula de MM, célula de SM, o diversas células de linfoma.

20 El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluye una forma modificada tal como un producto de sustitución (por ejemplo, un producto de sustitución de aminoácidos), que también se denomina como “variante”, un producto de adición, un producto de supresión (por ejemplo, una subsecuencia o fragmento), y similar. Tales formas y variantes modificadas del anticuerpo retienen la función o actividad al menos parcial del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  mostrada por la invención, tal como la unión con IL-3R $\alpha$ , o la modulación de la actividad o función (por ejemplo, transferencia de señales de IL-3R $\alpha$ ) de IL-3R $\alpha$ . En consecuencia, el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  modificado puede retener la capacidad para modular, por ejemplo, la unión al menos parcial de IL-3R $\alpha$  y una o más de las funciones o actividades de IL-3R $\alpha$  (por ejemplo, transferencia de señales, respuesta de señal, y similares).

30 Según esta memoria descriptiva, el término “alterar” (“modificar”) y sus versiones gramaticales significan que la composición deriva de una composición de referencia. Las proteínas, ácidos nucleicos y otras composiciones modificadas pueden tener mayores o menores actividades que una proteína, ácido nucleico u otra composición no modificada de referencia, o pueden tener una función diferente de una proteína, ácido nucleico u otra composición no modificada de referencia.

35 Tal anticuerpo que contiene una sustitución de aminoácidos puede ser codificado por un ácido nucleico. En consecuencia, la presente invención también proporciona una secuencia nucleotídica que codifica un anticuerpo que contiene una sustitución de aminoácidos.

40 El término “identidad” o “idénticas” significa que las dos o más sustancias citadas son la misma. En consecuencia, cuando dos secuencias proteicas (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ ) son idénticas, tienen las mismas secuencias de aminoácidos al menos con las regiones o porción citadas. La expresión “región idéntica” significa una región idéntica de dos o más sustancias citadas. De este modo, cuando dos secuencias proteicas son idénticas a lo largo de una o más regiones de las secuencias, tienen identidad en las regiones. “Sustancialmente idéntica” significa que una molécula está estructural o funcionalmente conservada de manera que la molécula tiene o se predice que tiene función o actividad al menos parcial de una o más de las funciones o actividades de la molécula de referencia, o región relevante/correspondiente o una porción de la molécula de referencia con la que comparte identidad. De este modo, los polipéptidos que tienen identidad sustancial (por ejemplo, anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ ) tienen o se predice que tienen al menos una parte de la actividad o función como un polipéptido de referencia (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ ). Por ejemplo, en una forma de realización específica, se considera que un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que tiene una o más modificaciones (por ejemplo, supresión, sustitución, adición o inserción de 1 a 3 restos de aminoácidos), que retiene actividad o función al menos parcial del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  sin modificar, tiene identidad sustancial con el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de referencia.

55 Debido a variaciones entre la proteína estructuralmente relacionada y la proteína funcionalmente relacionada, la cantidad de identidad de secuencia requerida para retener funciones o actividad en la proteína, región y función o actividad de la región. En el caso de proteína, una actividad o función puede ser retenida por la presencia de apenas 30% de identidad de secuencia de aminoácidos, pero en general, está presente una mayor identidad de 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97% o 98%, con la secuencia de referencia. El grado de identidad entre dos secuencias se puede verificar usando un programa de ordenador o algoritmo matemático conocido convencionalmente en el campo técnico. En tal algoritmo que calcula la relación de identidad de secuencia (homología), en general, se cuentan espacios y mal apareamientos de secuencias a lo largo de una región de comparación. Por ejemplo, el algoritmo de recuperación BLAST (por ejemplo, BLAST 2.0) (por ejemplo, véase Altschul et al., J. Mol. Biol., 215: 403 (1990), públicamente disponible mediante NCBI) tiene los siguientes parámetros de recuperación ilustrativos: mal apareamiento -2; comienzo del espacio 5; alargamiento del espacio 2. En la comparación de secuencias polipeptídicas, el algoritmo BLASTP se usa típicamente en combinación con una matriz de puntuación tal como PAM 100, PAM 250, BLOSUM 62, BLOSUM50.FASTA (por ejemplo, FASTA 2 y FASTA 3), y similares, y también se usa

un programa de comparación de secuencias SSEARCH para determinar el grado de identidad (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 2444 (1988); Pearson, Methods Mol. Bio., 132: 185 (2000); y Smith et al., J. Mol. Biol., 147: 195 (1981)). También se ha desarrollado un programa para determinar la similitud estructural de proteínas usando cartografiado topológico basado en Delaunary (Bostick et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 304: 320 (2003)).

5 Una “sustitución conservativa” es una sustitución de un aminoácido por un resto biológica, química o estructuralmente similar. Similitud biológica significa que una actividad biológica, tal como la actividad de unión a IL-3R $\alpha$ , no es destruida por la sustitución. Similitud estructural significa que los aminoácidos tienen una cadena lateral con una longitud similar (por ejemplo, alanina, glicina y serina), o tienen un tamaño similar. La similitud química  
10 significa que los restos tienen la misma carga o son hidrófilos o hidrófobos. Los ejemplos específicos incluyen la sustitución de un resto hidrófobo tal como isoleucina, valina, leucina, y metionina por otro resto, o la sustitución de un resto polar por otro resto, tal como la sustitución de arginina por lisina, la sustitución de ácido glutámico por ácido aspártico, o la sustitución de glutamina por asparagina, y la sustitución de serina por treonina.

15 Además, los ejemplos del anticuerpo modificado incluyen miméticos peptídicos que tienen uno o más D-aminoácidos sustituidos por L-aminoácidos (y una mezcla de los mismos), análogos estructurales y funcionales tales como aminoácidos o análogos de aminoácidos sintetizados o no naturales, y formas derivatizadas de los mismos. Los ejemplos de modificación incluyen una estructura cíclica, tal como un enlace amídico de extremo a extremo entre el término amino y carboxi de la molécula, o un enlace de disulfuro intra- o intermolecular o un enlace de disulfuro  
20 intramolecular o intermolecular.

ejemplos específicos no limitantes adicionales de las modificaciones de aminoácidos incluyen la secuencia parcial (subsecuencia) y fragmento de IL-3R $\alpha$ . La subsecuencia y fragmento ejemplares de IL-3R $\alpha$  incluyen una parte de la  
25 secuencia de IL-3R $\alpha$  a la que se une el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  ejemplar de la invención. También, la subsecuencia y fragmento ejemplificativos de IL-3R $\alpha$  incluyen una región de inmunogenicidad, tal como una parte de la IL-3R $\alpha$ , a la que se une el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  ejemplificativo de la invención.

Según la invención, se proporciona un ácido nucleico que codifica una subsecuencia o fragmento del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que retiene al menos una parte de la función o actividad del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ , y un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  no modificado o de referencia. En esta memoria descriptiva, el término “subsecuencia” o “fragmento” significa una porción de una molécula de longitud completa. La secuencia de aminoácidos que codifica la subsecuencia del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  es más corta que el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de longitud completa en al menos un aminoácido (por ejemplo, supresión de uno o más aminoácidos internos o terminales desde el término amino o término carboxi). La subsecuencia del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  tiene aminoácidos más pequeños que aquellos del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de longitud completa en al menos uno. La subsecuencia de ácido nucleico tiene nucleótidos menores que aquellos de la secuencia de ácido nucleico comparativa de longitud completa en al menos uno. En consecuencia, la subsecuencia puede ser una longitud opcional dentro de la longitud completa de IL-3R $\alpha$  nativa.  
35

La subsecuencia o fragmento del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  puede tener una afinidad de unión como el anticuerpo de longitud completa, y una especificidad de unión como el anticuerpo de longitud completa, o una o más actividades o funciones como el anticuerpo de longitud completa, tal como la función o actividad de un anticuerpo antagonista o agonista anti-IL-3R $\alpha$ . Las expresiones “subsecuencia funcional” y “fragmento funcional”, en el caso de referirse al anticuerpo, significan una porción del anticuerpo que retiene una o más funciones o actividades como el anticuerpo de referencia de longitud completa, tal como al menos una parte de la función o actividad del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ .  
40 Por ejemplo, una subsecuencia del anticuerpo que se une a IL-3R $\alpha$  o a un fragmento de IL-3R $\alpha$  es considerada una subsecuencia funcional.

La subsecuencia y fragmento del anticuerpo se pueden combinar. Por ejemplo, una subsecuencia de VL o VH se puede conectar mediante una secuencia enlazadora y de ese modo formar un anticuerpo quimérico VL-VH. Una combinación de subsecuencias de Fv monocatenario Fv(scFv) se pueden conectar mediante una secuencia enlazadora y de ese modo pueden formar un anticuerpo quimérico scFv-scFv. La subsecuencia y fragmento del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluyen un anticuerpo monocatenario o región variable, sola o en combinación con toda o una porción de otra subsecuencia del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ .  
50

La subsecuencia y fragmento del anticuerpo se pueden preparar mediante hidrólisis del anticuerpo mediante su proteolisis, por ejemplo mediante una digestión con pepsina o papaína de todo el anticuerpo. La subsecuencia y fragmento del anticuerpo obtenidos mediante escisión enzimática con pepsina proporciona un fragmento 5S representado por F(ab')<sub>2</sub>. Este fragmento se puede escindir adicionalmente usando un agente reductor de tiol para formar un fragmento monovalente Fab' 3.5S. Alternativamente, una escisión enzimática que usa pepsina produce directamente dos fragmentos Fab' monovalentes y un fragmento Fc (véanse, por ejemplo, la patente US nº 4.036.945 y la patente US nº 4.331.647; y Edelman et al., Methods Enzymol., 1: 422 (1967)). Se pueden usar otros métodos para escindir un anticuerpo, tal como la separación de una cadena pesada para formar un fragmento de cadena ligera-cadena pesada monovalente, la escisión adicional del fragmento u otro método enzimático o químico.  
60

65 Una proteína y un anticuerpo, así como su subsecuencia y fragmento, se pueden preparar usando ingeniería

genética. La tecnología incluye el gen total o parcial que codifica una proteína o un anticuerpo que se expresa en una célula hospedante tal como una célula COS y *E. coli*. Una célula hospedante recombinante sintetiza la secuencia completa o una subsecuencia tal como scFv (tal como Whitlow et al, en: *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991), Bird et al, *Science* 242:423 (1988); y patente US nº 4.946.778). Un Fv monocatenario y un anticuerpo se pueden preparar según el procedimiento como se describe en la patente US nº 4.946.778 y la patente US nº 5.258.498; Huston et al, *Methods Enzymol* 203:46 (1991); Shu et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:7995 (1993); y Skerra et al, *Science* 240:1038 (1988).

La forma modificada incluye una secuencia derivatizada, tal como aminoácidos en los que los grupos amino libre forman hidrocloreto de amina, grupo p-toluenosulfonilo y grupo carbobenzoquinona; los grupos carboxi libre que forman una sal o éster metílico y etílico; y los grupos hidroxilo libres forman un derivado O-acílico u O-alquílico, y derivados de aminoácidos que existen de forma natural tales como 4-hidroxi prolina (derivado de prolina), 5-hidroxisina (derivado de lisina), homoserina (derivado de serina), ornitina (derivado de lisina), y similares. La modificación se puede llevar a cabo usando un método conocido convencionalmente en el campo técnico (por ejemplo, mutagénesis por supresión o inserción específica del sitio basado en PCR, modificación química y mutagénesis, reticulación y similar).

Los productos de adición y los productos de inserción están incluidos en las formas modificadas de las composiciones proteicas (por ejemplo, anticuerpo), de ácidos nucleicos y otras composiciones. Por ejemplo, la adición puede ser un enlace covalente o no covalente con cualquier tipo de moléculas de proteína (por ejemplo, anticuerpo), ácido nucleico u otras composiciones. En general, la adición e inserción confieren función o actividad diferente.

Los polipéptidos o secuencias de ácidos nucleicos de fusión (quiméricos) están incluidos en el producto de adición y en el producto de inserción, y estas son secuencias que tienen una o más moléculas que generalmente no están presentes en la secuencia nativa (de tipo salvaje) de referencia unida covalentemente a la secuencia mencionada anteriormente. Un ejemplo específico es una secuencia de aminoácidos de otra proteína (por ejemplo, un anticuerpo) para producir una proteína multifuncional (por ejemplo, un anticuerpo multiespecífico).

También, el anticuerpo de la invención incluye un producto quimérico o de fusión en el que uno o más dominios adicionales están enlazados covalentemente a aquél, a fin de conferir una función o actividad diferente o complementaria. Los ejemplos del anticuerpo incluyen un producto quimérico o de fusión que no está presente de forma natural, y en el que dos o más secuencias de aminoácidos están mutuamente enlazadas.

Según la invención, se proporciona un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  que contiene un dominio heterólogo y un ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ . El dominio heterólogo puede ser un producto de adición o producto de inserción de aminoácidos, pero no está limitado a un resto de aminoácido. En consecuencia, el dominio heterólogo puede estar compuesto de uno cualquiera de diversos tipos diferentes de partes funcionales pequeñas o grandes. Tal parte incluye un ácido nucleico, un péptido, un hidrato de carbono, un lípido o un compuesto orgánico pequeño, tal como un fármaco, un metal (oro, plata) y similar.

Los ejemplos específicos no limitantes del dominio heterólogo incluyen una etiqueta, un marcador detectable y un agente citotóxico. Los ejemplos específicos de la etiqueta y del marcador detectable incluyen etiquetas T7, His, myc, HA y FLAG; enzimas (peroxidasa de rábano picante, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, cloranfenicol transferasa); sustratos enzimáticos; ligandos (por ejemplo, biotina); receptores (avidina); radionúclidos (por ejemplo, C14, S35, P32, P33, H3, I125 e I131); reactivos de densidad electrónica; moléculas de transferencia de energía; marcadores paramagnéticos; fluoróforo (fluoresceína, rodamina, ficoeritrina); cromóforo; agentes quimioluminiscentes (imidazol, luciferasa) y agentes bioluminiscentes. Los ejemplos específicos del agente citotóxico incluyen toxina de la difteria (difteria, toxina), toxina del cólera, y lisina.

Se puede insertar una secuencia enlazadora entre la proteína (por ejemplo, un anticuerpo), ácido nucleico u otra composición y el producto de adición o producto de inserción (por ejemplo, un dominio heterólogo), de manera que los dos sustratos mantienen al menos una parte de función o actividad diferente. La secuencia enlazadora puede tener una o más propiedades que pueden acelerar cualquiera de los dominios, o puede portar reacción mutua con cualquiera de los dominios, y tales características incluyen imposibilidad para formar una estructura flexible y una estructura secundaria ordenada, o propiedad hidrófoba o propiedad de carga. Los ejemplos de los aminoácidos que se encuentran generalmente en las regiones proteicas flexibles incluyen glicina, asparagina y serina. Otros aminoácidos próximos a la neutralidad, tales como treonina y alanina, también se pueden usar en la secuencia enlazadora. La longitud de la secuencia enlazadora se puede variar (véase, por ejemplo, la patente US nº 6.087.329). El enlazador incluye además agentes de reticulación química y agentes de unión (agentes conjugantes) tales como un derivado sulfo-succinimidílico (sulfo-SMCC, sulfo-SMPB), disuccinimidil suberato (DSS), disuccinimidil glutarato (DSG) y disuccinimidil tartrato (DST).

Otros ejemplos de la adición incluyen uno cualquiera de glucosilación, ácido graso, lípido, acetilación, fosforilación, amidación, formilación, ubiquitinación y derivatización mediante un grupo protector o bloqueante, y un gran número de modificaciones químicas. Otras sustituciones y posibilidades pueden ser fácilmente entendidas por los expertos

en la técnica, y se considera que están comprendidas dentro del alcance de la invención.

Tal secuencia modificada se puede preparar usando técnicas de ADN recombinante que median la expresión celular o la traducción *in vitro*. Las secuencias de ácido nucleico y los polipéptidos también se pueden preparar mediante un método conocido convencionalmente en el campo técnico, tal como síntesis química usando un sintetizador de péptidos automatizado (véase, por ejemplo, Applied Biosystems, Foster City CA).

Los anticuerpos modificados y los anticuerpos variantes, tales como productos de sustitución, productos de adición de subsecuencias, y similares, pueden mantener actividad detectable del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ . En una realización, el anticuerpo modificado tiene la actividad para unirse a la molécula de IL-3R $\alpha$  e induce reducción o eliminación de células que expresan IL-3R $\alpha$  mediante un sistema inmune que se centra principalmente en una célula efectora. El anticuerpo modificado se refiere al control funcional de células que expresan IL-3R $\alpha$ , e inducen supervivencia, crecimiento, detención, muerte celular, y similar, de las células. La muerte celular incluye apoptosis, necrosis, autofagia, y similar.

#### (Método de identificación de IL-3R $\alpha$ )

También se describen en la presente memoria un método libre de células y un método a base de células (por ejemplo, *in vivo* o *in vitro*) que criba, detecta e identifica IL-3R $\alpha$  (por ejemplo, en una disolución o mediante una fase sólida). Estos métodos se pueden llevar a cabo en una disolución *in vitro* usando un biomaterial o muestra, e *in vivo* usando por ejemplo una muestra de una célula derivada de animal (por ejemplo, linfocito). El método puede comprender una etapa de puesta en contacto de un biomaterial o muestra con un anticuerpo unido a IL-3R $\alpha$  bajo una condición que permita la unión del anticuerpo con IL-3R $\alpha$ , y una etapa para evaluar el anticuerpo unido a IL-3R $\alpha$ . La presencia de IL-3R $\alpha$  se detecta mediante la unión del anticuerpo que se une a IL-3R $\alpha$ . IL-3R $\alpha$  puede estar presente en una célula o tejido. El biomaterial o muestra mencionado anteriormente se puede obtener de un analito de mamífero.

La expresión "puesta en contacto", cuando se usa en relación con la composición, tal como una proteína (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ ), un material, una muestra o tratamiento, significa una interacción directa o indirecta entre la composición (por ejemplo, anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ ) y otra sustancia de referencia. Los ejemplos específicos de la interacción directa incluyen el enlazamiento. Los ejemplos específicos de la interacción indirecta incluyen aquel caso en el que la composición actúa sobre una molécula intermedia, y esta molécula intermedia actúa entonces sobre la sustancia de referencia. En consecuencia, por ejemplo, la puesta en contacto de una célula (por ejemplo, linfocito) con el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluye permitir que el anticuerpo se una a la célula (por ejemplo, a través de la unión a IL-3R $\alpha$ ), o permitir que el anticuerpo actúe sobre una sustancia intermedia, seguido de la acción de esta sustancia intermedia sobre la célula.

Los términos "evaluar" y "medir", y sus versiones gramaticales, se usan de forma sinónima en la memoria descriptiva, y significan la medida cualitativa y la medida cuantitativa, o tanto la medida cualitativa como la medida cuantitativa. Cuando estos términos se usan en relación con la unión, incluyen cualquier medio para evaluar la cantidad relativa, la afinidad o especificidad de la unión, incluyendo diversos métodos que se describen en la memoria descriptiva y que se conocen convencionalmente en el campo técnico. Por ejemplo, la unión del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  con IL-3R $\alpha$  se puede evaluar o medir mediante un ensayo de citometría de flujo.

#### (Producción de anticuerpo)

Se describe en la presente memoria un método para producir un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana que tiene citotoxicidad para células positivas para IL-3R $\alpha$ . El método puede comprender administrar una región extracelular de IL-3R $\alpha$  humana conjugada con una proteína recombinante IL-3R $\alpha$  humana o un gen de IL-3R $\alpha$  introduciendo células en animales capaces de expresar inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones transgénicos o ganado transgénico); identificar el animal para la expresión de un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana; seleccionar el animal que produce el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana; y aislar el anticuerpo del animal seleccionado.

La proteína IL-3R $\alpha$  humana adecuada para la producción del anticuerpo se puede producir mediante una cualquiera de diversas técnicas de expresión recombinante y purificación de proteínas estándar. Por ejemplo, la secuencia de IL-3R $\alpha$  se puede preparar mediante técnicas estándar de síntesis peptídica, tales como una síntesis en fase sólida. A fin de facilitar la purificación de la proteína expresada o sintetizada, una porción de la proteína puede contener una secuencia de aminoácidos tal como una etiqueta FLAG, una etiqueta T7, una secuencia de polihistidina, o similar. La proteína se expresa en el interior de las células, y se puede purificar. La proteína se puede expresar mediante un método de recombinación como parte de una proteína más grande (por ejemplo, un producto de fusión o quimérico). La IL-3R $\alpha$  adecuada para generar la respuesta inmune incluye subsecuencias de IL-3R $\alpha$  tales como un fragmento de inmunogenicidad. También se describe una célula que expresa IL-3R $\alpha$ , una preparación o extracto celular o fracción que contiene IL-3R $\alpha$ , y una IL-3R $\alpha$  parcialmente purificada.

El método para preparar anticuerpo policlonal y anticuerpo monoclonal es conocido convencionalmente en el campo técnico. Por ejemplo, IL-3R $\alpha$  o su fragmento de inmunogenicidad se usa para inmunizar un animal conjugándolo opcionalmente con un portador tal como hemocianina de lapa californiana (KLH) u ovoalbúmina (por ejemplo, BSA), o mezclándola con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund o adyuvante incompleto de Freund.

5 Aislando una célula del bazo derivada de un animal inmunizado que responde a IL-3R $\alpha$ , se puede fusionar con una célula de mieloma usando técnicas de hibridoma. Los anticuerpos monoclonales producidos mediante hibridomas se pueden identificar para determinar la reactividad con IL-3R $\alpha$  o su fragmento de inmunogenicidad.

10 El animal que se puede inmunizar incluye los primates, ratón, rata, conejo, cabra, oveja, ganado y cobaya. La inmunización inicial, y cualquier inmunización opcionalmente subsiguiente, puede ser mediante la vía intravenosa, vía intraperitoneal, vía intramuscular o vía subcutánea. Además, a fin de incrementar la respuesta inmune, el antígeno se puede conjugar con otra proteína, tal como hemocianina de lapa californiana (KLH), tiroglobulina y toxoide del tétano, o se puede mezclar con un adyuvante tal como adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, y similar. La inmunización inicial, y cualquier inmunización opcionalmente subsiguiente, puede ser a través de la vía intraperitoneal, vía intramuscular, vía intraocular o vía subcutánea. La inmunización puede ser a la misma concentración o concentración diferente de una preparación de IL-3R $\alpha$ , o a intervalos regulares o irregulares.

20 El animal incluye aquellos que se modifican genéticamente para incluir loci de genes humanos, y se puede preparar un anticuerpo humano usando el mismo. Los ejemplos de los animales transgénicos con uno o más genes de inmunoglobulina humana se describen, por ejemplo, en la patente US n° 5.939.598, documentos WO02/43478 y WO02/092812. Usando una técnica de hibridoma convencional, se aíslan células del bazo de ratón inmunizado que tiene respuesta elevada al antígeno, y se fusionan con célula de mieloma. Se puede obtener un anticuerpo monoclonal que se une a IL-3R $\alpha$ .

25 El método para producir un anticuerpo policlonal humano y un anticuerpo monoclonal humano se describe adicionalmente (véase, tal como Kuroiwa et al., Nat. Biotechnol. 20:889 (2002); docs WO98/24893; WO92/01047; WO96/34096; WO96/33735; patente US n° 5.413.923; patente US n° 5.625.126; patente US n° 5.633.425; patente US n° 5.569.825; patente US n° 5.661.016; patente US n° 5.545.806; patente US n° 5.814.318; patente US n° 5.885.793; patente US n° 5.916.771; y patente US n° 5.939.598).

30 El término "humano", cuando se usa haciendo referencia a un anticuerpo, significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo es completamente la secuencia de aminoácidos humana, a saber, regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera humanas y región constante humana. En consecuencia, todos los aminoácidos son aminoácidos humanos, o están presentes en el anticuerpo humano. Un anticuerpo que es un anticuerpo no humano se puede obtener en un anticuerpo completamente humano sustituyendo los restos de aminoácidos no humanos por los restos de aminoácidos que están presentes en el anticuerpo humano. Los restos de aminoácidos que están presentes en el anticuerpo humano, el mapa de las regiones CDR y los restos de consenso del anticuerpo humano son bien conocidos en el campo técnico (véase, por ejemplo, Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, US Department of Health and Human Services, Public Health Service (1987); Chothia y Lesk (1987)). En Padlan, Mol. Immunol., 31: 169 (1994) y Padlan, Mol. Immunol., 28: 489 (1991) se describen como objeto una secuencia de consenso del subgrupo III de VH humana basado en la investigación llevada a cabo usando 22 secuencias de VH III humana conocidas, y una secuencia de consenso de subgrupo I de cadena  $\kappa$  de VL humana basado en la investigación llevada a cabo usando 30 secuencias de subgrupo I de cadena  $\kappa$  humana conocidas. En consecuencia, el anticuerpo humano incluye un anticuerpo en el que uno o más restos de aminoácidos se han sustituido por uno o más aminoácidos existentes en un anticuerpo humano distinto opcional.

45 Los ejemplos del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  incluyen anticuerpos preparados usando un método conocido en el campo técnico, tal como injerto de CDR (documentos EP 239.400; WO91/09967; patente US n° 5.225.539; patente US n° 5.530.101; y patente US n° 5.585.089), sustitución de restos interactivos de la superficie por aminoácidos de una secuencia de anticuerpo humano, modificación del patrón de los anticuerpos en la superficie (documento EP592.106; EP519.596; Padlan, Molecular Immunol. 28: 489 (1991); Studnicka et al., Protein Engineering 7: 805 (1994); Roguska et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 969 (1994)) y barajado de cadenas (patente US n° 5.565.332). A fin de producir un anticuerpo humanizado, se ha usado (Padlan, Mol. Immunol. 31:169 (1994); y Padlan, Mol. Immunol. 28: 489 (1991)) la secuencia de consenso humana (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 (1992); y Presta et al, J. Immunol. 151: 2623 (1993)).

50 El término "humanizado", cuando se usa en relación con un anticuerpo, significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo tiene uno o más restos de aminoácidos no humanos (por ejemplo, ratón, rata, cabra, conejo, y similar) de la región determinante de la complementariedad (CDR) que se une específicamente a un antígeno deseado en una molécula inmunoglobulínica humana aceptora, y uno o más restos de aminoácidos humanos (restos de aminoácidos que están flanqueados con CDR) en la región estructural (FR) de Fv. El anticuerpo denominado "primatizado" está dentro del alcance del significado de "humanizado", excepto que los restos de aminoácidos de la molécula inmunoglobulínica humana aceptora y la región estructural pueden ser cualesquiera restos de aminoácidos de primate (por ejemplo, mono, gibón, gorila, chimpancé, orangután, macaco), además de restos humanos. Los

restos de FR humanos de la inmunoglobulina se pueden sustituir por los restos no humanos correspondientes. En consecuencia, por ejemplo, a fin de alterar, generalmente mejorar, la afinidad o especificidad por el anticuerpo, los restos en la región CDR o en la región estructural humana se pueden sustituir por los restos correspondientes del anticuerpo donante de región CDR o estructural no humana. El anticuerpo humanizado puede contener restos que no se pueden encontrar en el anticuerpo humano ni en la secuencia de CDR o estructural donante. Por ejemplo, se puede predecir que la sustitución en FR de una posición particular que no se puede encontrar en el anticuerpo humano o en el anticuerpo no humano donante puede mejorar la afinidad o especificidad de unión del anticuerpo humano en esta posición. Las sustituciones estructurales y de CDR del anticuerpo en base al modelado molecular son convencionalmente conocidas en el campo de la técnica, por ejemplo mediante el modelado de la interacción de restos de CDR y estructurales para identificar restos estructurales importantes para la unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos estructurales inusuales en la posición específica (véanse, por ejemplo, patente US nº 5.585.089; y Riechmann et al., *Nature*, 332:323 (1988)).

Los anticuerpos quiméricos están incluidos en el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ . Según la presente memoria, el término "quimérico" y sus variaciones gramaticales, cuando se usa en relación con anticuerpos, significa que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo contiene una o más porciones que derivan de dos o más especies diferentes, se obtiene o aísla de dos o más especies diferentes, o se basa en dos o más especies diferentes. Por ejemplo, una porción del anticuerpo puede ser humana (por ejemplo, región constante) y otra porción del anticuerpo puede ser no humana (por ejemplo, una región variable de cadena pesada de ratón o de cadena ligera de ratón). En consecuencia, un ejemplo del anticuerpo quimérico incluye un anticuerpo en el que la porción diferente del anticuerpo deriva de una especie diferente. A diferencia del anticuerpo humanizado o primatizado, el anticuerpo quimérico puede tener una secuencia de una especie diferente en una región arbitraria del anticuerpo.

El método para producir un anticuerpo quimérico es conocido en el campo técnico (tal como Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi et al., *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies et al., *J. Immunol. Methods* 125: 191 (1989); patente US nº 5.807.715; patente US nº 4.816.567; y patente US nº 4.816.397). Por ejemplo, en Munro, *Nature* 312: 597 (1984); Neuberger et al., *Nature* 312: 604 (1984); Sharon et al., *Nature* 309: 364 (1984); Morrison et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 81: 6851 (1984); Boulianne et al., *Nature* 312: 643 (1984); Capon et al., *Nature* 337: 525 (1989); y Traunecker et al., *Nature* 339: 68 (1989), un anticuerpo quimérico en el que una región variable del anticuerpo derivada de una especie se sustituye por una región variable de anticuerpo derivada de otra especie.

Además, el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  se puede preparar mediante técnica de hibridoma, técnica recombinante, y técnica de presentación de fagos, y una combinación de las mismas (véanse patente US nº 4.902.614, patente US nº 4.543.439, y patente US nº 4,411,993; y también véanse *Monoclonal Antibodies. Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, Kennett, McKearn, y Bechtol et al, 1980, y Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, segunda edición, 1988).

El anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  humana de la invención se produjo usando ratones con cromosomas transferidos (ratones KM (marca registrada)) inmunizados con diversas formas de una forma soluble de proteínas IL-3R $\alpha$  humanas recombinantes, o estirpes celulares que expresan IL-3R $\alpha$  (documentos WO02/43478, WO02/092812, e Ishida et al., IBC's 11th Antibody Engineering Meeting, Abstract (2000)). Puesto que el anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  humana tiende de forma detectable no una estirpe celular precursora no transformada sino una estirpe celular transfectante estable de IL-3R $\alpha$  humana, tal como la célula Jurkat-IL-3R $\alpha$  y la célula L929-IL-3R $\alpha$ , se muestra que el anticuerpo se une específicamente a IL-3R $\alpha$  humana.

El anticuerpo de la invención puede tener una secuencia de cadena ligera  $\kappa$  o una secuencia de cadena ligera  $\lambda$ , una longitud completa de cualquiera de ellas como se presentan en el anticuerpo que existe de forma natural, o una mezcla de las mismas (principalmente un producto de fusión de la secuencia de cadena  $\kappa$  y la secuencia de cadena  $\lambda$ ), y sus subsecuencias/fragmentos. Las moléculas de anticuerpo que se presentan de forma natural pueden contener dos cadenas ligeras  $\kappa$  o dos cadenas ligeras  $\lambda$ .

Se describe en la presente memoria un método para preparar un anticuerpo que se une específicamente a IL-3R $\alpha$ . El método para preparar un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  puede comprender administrar IL-3R $\alpha$  humana, una subsecuencia de la misma o un fragmento de la misma (por ejemplo, región extracelular de IL-3R $\alpha$ ), conjugada, si es necesario, con una proteína recombinante Fc humana, a animales que pueden expresar inmunoglobulina humana (por ejemplo, ratones transgénicos o ganado transgénico), identificar los animales en busca de su expresión del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana, seleccionar un animal que produce anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana, y aislar el anticuerpo del animal seleccionado. Mediante este método se puede juzgar si el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana tiene o no una actividad antagonista o agonista de IL-3R $\alpha$ .

La actividad efectora significa actividad dependiente del anticuerpo inducida vía una región Fc del anticuerpo, y como tal se conocen la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (actividad de ADCC), citotoxicidad dependiente del complemento (actividad de CDC), fagocitosis dependiente del anticuerpo (actividad de ADP) mediante fagocitos tales como macrófagos y células dendríticas, y similares.

5 Como método para controlar la actividad efectora del anticuerpo monoclonal anti-IL-3R $\alpha$  de la invención, los ejemplos incluyen un método que controla la cantidad de la fucosa (también denominada fucosa central) que está unida a N-acetilglucosamina (GlcNAc) a través de un enlace  $\alpha$ -1,6 en un extremo reductor de una cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo que está unida a asparagina (Asn) en la posición 297 de una región Fc de un anticuerpo (documentos WO2005/035586, WO2002/31140, y WO00/61739), un método en el que se controla modificando restos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo, y similar. La actividad efectora se puede controlar aplicando uno cualquiera de estos métodos al anticuerpo monoclonal anti-IL-3R $\alpha$  de la invención.

10 Controlando el contenido de la fucosa central de la cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo de Fc del anticuerpo, se puede aumentar o disminuir la actividad efectora del anticuerpo. Como método para reducir el contenido de la fucosa que se une a la cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo que está unida a Fc del anticuerpo, se puede mencionar la defucosilación (defucosilada o no fucosilada). La defucosilación es expresar un anticuerpo usando célula CHO de la que se ha eliminado el gen de  $\alpha$ 1,6-fucosil-transferasa, y se puede obtener un anticuerpo al que no está unida la fucosa. El anticuerpo al que no está unida la fucosa tiene actividad de ADCC elevada. Por otro lado, como método para incrementar el contenido de la fucosa que se une a la cadena de azúcar enlazada mediante N de tipo complejo a la que está unido Fc del anticuerpo, el anticuerpo al que está unida la fucosa se puede obtener expresando el anticuerpo usando una célula hospedante en la que se introduce el gen de  $\alpha$ 1,6-fucosiltransferasa. El anticuerpo al que está unida la fucosa tiene actividad de ADCC menor que aquella del anticuerpo al que no está unida la fucosa.

20 Además, la actividad de ADCC y la actividad de CDC se pueden aumentar o disminuir modificando los restos de aminoácidos de la región Fc del anticuerpo. Por ejemplo, la actividad de CDC del anticuerpo se puede incrementar usando la secuencia de aminoácidos de la región Fc descrita en el documento US 2007/0148165. También, la actividad de ADCC o la actividad de CDC se puede aumentar o disminuir llevando a cabo la modificación de aminoácidos descrita en las patentes US n $^{\circ}$  6.737.056, US n $^{\circ}$  7.297.775 y US n $^{\circ}$  7.317.091. Además, un anticuerpo en el que se controla la actividad efectora del anticuerpo se puede obtener usando los métodos mencionados anteriormente en combinación en un anticuerpo.

30 Se describe adicionalmente la secuencia nucleotídica de la invención, tal como de un vector y similar. El vector puede comprender una secuencia de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ , o una subsecuencia o fragmento del mismo.

35 El ácido nucleico puede tener diversas longitudes. La longitud del ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de la presente invención o la subsecuencia del mismo es generalmente alrededor de 100 a 600 nucleótidos, o cualquier valor numérico o intervalo que comprende tales longitudes del intervalo descrito anteriormente; 100 a 150, 150 a 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 350, 350 a 400, 400 a 450, 450 a 500, 500 a 550 o 550 a 600 nucleótidos de longitud, o cualquier valor numérico o intervalo o valor dentro de o que comprende tal longitud del intervalo descrito anteriormente. Los ejemplos de la longitud del ácido nucleico que codifica el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  de la presente invención o la subsecuencia del mismo incluyen generalmente 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50, 50 a 100, 100 a 150, 150 a 40 200, 200 a 250, 250 a 300, 300 a 400, 400 a 500, 500 a 600 nucleótidos, y cualquier valor numérico o intervalo dentro de o que engloba tal longitud.

45 Las expresiones "ácido nucleico" y "polinucleótido" significan al menos dos o más pares de bases de ácido ribo- o desoxirribonucleico (nucleótidos) que están enlazados a través de un enlace de fosfoéster o equivalente. El ácido nucleico incluye polinucleótido y polinucleósido. El ácido nucleico incluye una sola molécula, una molécula doble, una molécula triple, una molécula circular o una molécula lineal. Los ejemplos del ácido nucleico incluyen ARN, ADN, ADNc, un ácido nucleico genómico, un ácido nucleico de origen natural y un ácido nucleico no natural, tal como un ácido nucleico sintético, pero no está limitado. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos cortos (por ejemplo, 10 a 20, 20 a 30, 30 a 50, 50 a 100 nucleótidos) se denominan habitualmente "oligonucleótidos" o "sondas" de ADN 50 monocatenario o bicatenario.

55 El ácido nucleico se puede preparar usando diversas técnicas de clonación estándar y técnicas de síntesis química. Los ejemplos de las técnicas incluyen, pero no se limitan a, amplificación de ácidos nucleicos, tal como reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con dianas de ADN genómico o ADNc usando cebadores (por ejemplo, una mezcla de cebadores degenerados) que se pueden hibridar con una secuencia codificante de anticuerpo. Además, el ácido nucleico también se puede preparar mediante síntesis química (por ejemplo, síntesis de fosfoamidito en fase sólida) o transcripción a partir de un gen. Después, la secuencia preparada se puede expresar mediante una célula (por ejemplo, una célula hospedante tal como levadura, bacteria o eucariota (una célula de animal o de mamífero o en una planta)), después la secuencia se clona en un plásmido y después se amplifica, o la secuencia se traduce *in vitro*. 60

65 Un vector es un vehículo que se puede manipular mediante inserción o incorporación de ácido nucleico. Los ejemplos del vector incluyen un vector plasmídico, un vector vírico, un vector procariota (bacteria) y un vector eucariota (planta, hongos, mamíferos). El vector se puede usar para la expresión *in vitro* o *in vivo* de ácido nucleico. Tal vector se denomina "vector de expresión", y es útil para la transferencia de ácido nucleico, incluyendo un ácido

nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  o su subsecuencia o fragmento, y la expresión de una proteína codificada *in vitro* (por ejemplo, en una disolución o en fase sólida), mediante una célula o mediante *in vivo* en un sujeto.

5 Además, el vector también se puede usar para la manipulación de ácidos nucleicos. Para la manipulación genética, un ácido nucleico insertado se puede transcribir o traducir usando un "vector de clonación" *in vitro* (por ejemplo, en una disolución o en fase sólida) en una célula, o *in vivo* en un sujeto.

10 En general, el vector contiene un origen de replicación para la amplificación en una célula *in vitro* o *in vivo*. A fin de facilitar la transcripción y traducción, si es necesario, se pueden incluir elementos de control tales como un elemento de control de expresión presente en el vector.

15 Un vector puede incluir un marcador de selección. El "marcador de selección" es un gen que permite la selección de una célula que contiene el gen. "Selección positiva" significa un proceso para seleccionar una célula que contiene el marcador de selección debido a una selección positiva. La resistencia a fármacos es un ejemplo del marcador de selección positiva, y una célula que contiene el marcador sobrevivirá en el medio de cultivo que contiene el fármaco, y una célula que no contiene el marcador morirá. Los ejemplos del marcador de selección incluyen genes de multirresistencia tales como *neo*, que proporciona resistencia a G418; *hygr*, que proporciona resistencia a higromicina; *puro*, que proporciona resistencia a puromicina, y similares. Otro marcador de selección positiva incluye genes que permiten la identificación o selección de una célula que contiene el marcador. Los ejemplos de estos genes incluyen un gen de proteína fluorescente (GFP) y cromóforo similar a GFP, luciferasa), gen *lacZ*, gen de fosfatasa alcalina, y un marcador de superficie tal como CD8. "Selección negativa" significa un proceso de exterminio de las células que contienen marcadores de selección negativa al exponerlas a un agente de selección negativa apropiado. Por ejemplo, una célula que contiene el gen de timidina cinasa del virus del herpes simple (HSV-tk) (Wigler et al., Cell, 11: 223 (1977)) es sensible al fármaco ganciclovir (GANC). De forma similar, el gen *gpt* hace a una célula sensible a 6-tioxantina.

20 El vector vírico incluye aquellos que se basan en retrovirus (un lentivirus para infectar no solamente a células que se dividen sino también a células que no se dividen), virus espumoso (patente US nº 5.624.820, patente US nº 5.693.508, patente US nº 5.665.577, patente US nº 6.013.516 y patente US nº 5.674.703; documentos WO 92/05266 y WO 92/14829), adenovirus (patente US nº 5.700.470, patente US nº 5.731.172 y patente US nº 5.928.944), virus adenoasociado (AAV) (patente US nº 5.604.090), un vector vírico del herpes simple (patente US nº 5.501.979), un vector del sistema de citomegalovirus (CMV) (patente US nº 5.561.063), reovirus, genoma de rotavirus, virus del simio 40 (SV40) o virus del papiloma (Cone et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6349 (1984); Eukaryotic Viral Vectors, Cold Spring Harbor Laboratory, editado por Gluzman, 1982; Sarver et al., Mol. Cell. Biol., 1: 486 (1981); patente US nº 5.719.054). El adenovirus infecta de forma eficiente a una célula que se replica lentamente y/o terminalmente diferenciada, y se puede usar para dirigirlo a la célula que se replica lentamente y/o a la célula terminalmente diferenciada. ejemplos adicionales de vectores víricos útiles para la expresión incluyen parvovirus, virus de Norwalk, coronavirus, paramixovirus y rhabdovirus, virus de toga (por ejemplo, virus Sindobis y virus del bosque de Semliki) y virus de la estomatitis vesicular (VSV).

35 Un vector que comprende un ácido nucleico se puede expresar cuando el ácido nucleico está conectado a elementos de expresión para funcionar. La expresión "conectado para funcionar" (operablemente enlazado) significa que una relación física o funcional entre los elementos citados les permite operar en su manera pretendida. En consecuencia, el ácido nucleico "operablemente enlazado" a un elemento de control de expresión significa que el elemento de control modula la transcripción del ácido nucleico y, según sea apropiado, la traducción del producto de transcripción.

40 El "elemento de control de expresión" o "secuencia de control de expresión" es un polinucleótido que influye sobre la expresión de un ácido nucleico operablemente enlazado. Los promotores y potenciadores son ejemplos específicos no limitantes de elementos y secuencias que controlan la expresión. El "promotor" es una región reguladora del ADN que actúa en cis, que puede iniciar la transcripción de una secuencia de ácido nucleico hacia el extremo 3' (dirección 3'). Un nucleótido que acelera el inicio de la transcripción está incluido en la secuencia promotora. El potenciador también regula la expresión del ácido nucleico, pero actúa a una distancia desde el sitio de iniciación de la transcripción del ácido nucleico al que está operablemente enlazado. Cuando el potenciador está presente en el extremo 5' o en el extremo 3' del ácido nucleico, así como en el ácido nucleico (por ejemplo, secuencia codificante o intrón), el potenciador funcional adicionalmente. ejemplos adicionales del elemento de control de expresión incluyen una secuencia líder y una secuencia de pareja de fusión, un elemento de sitio de entrada al ribosoma interno (IRES) para preparar multigén, un mensaje policistrónico, una señal de ajuste de intrón, mantenimiento del marco de lectura correcto del gen para permitir la traducción de ARNm en el marco, señal de poliadenilación que produce una poliadenilación apropiada del producto de transcripción de interés, y codones de parada.

50 Los ejemplos del elemento de control de expresión incluyen un elemento "constitucional" en el que la transcripción de un ácido nucleico operablemente enlazado se produce sin la presencia de señales o estímulo. El elemento de control de expresión que confiere expresión en respuesta a la señal o estímulo y aumenta o disminuye la expresión del ácido nucleico operablemente enlazado es "ajutable". El elemento ajustable que aumenta la expresión del ácido

nucleico operablemente enlazado en respuesta a una señal o estímulo se denomina “elemento inducible”. El elemento ajustable que disminuye la expresión del ácido nucleico operablemente enlazado en respuesta a una señal o estímulo se denomina “elemento represor” (principalmente, la señal disminuye la expresión; y la expresión aumenta cuando se elimina o no está presente la señal).

5 Los ejemplos del promotor constitucional para la expresión bacteriana incluyen un promotor inductor, tal como T7 y pL, plac, ptrp y ptac (promotor híbrido ptrp-lac) o bacteriófago  $\lambda$ , y similar. Para un sistema de célula de insecto, se puede usar un promotor constitucional o un promotor inducible (por ejemplo, ecdisona). El promotor constitucional para levadura incluye un promotor inductor tal como ADH, LEU2, GAL y similar (por ejemplo, véanse Ausubel et al.,  
10 en: Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 2, Capítulo 13, Greene Publish. Assoc. & Wiley Interscience edition, 1988; Grant et al., en: Methods in Enzymology, 153: 516 - 544 (1987) Wu & Grossman, 1987, Acad. Press, N.Y.; Glover, DNA Cloning, Vol. 11, Capítulo 3, IRL Press, Wash., D.C., 1986; Bitter, en: Methods in Enzymology, 152: 673 - 684 (1987), editado por Berger & Kimmel, Acad. Press, N.Y.; y Strathern et al., The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, editado por Cold Spring Harbor Press, Vol. 1 y Vol. 11 (1982)).

15 Para la expresión en mamíferos, se puede usar un promotor constitucional derivado de un virus o de otro origen. Por ejemplo, se pueden usar promotores inducibles derivados de CMV, SV40, o una secuencia de repetición terminal larga (LTR) viral, o genoma de célula de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína IIA; promotor de choque térmico, elemento que responde a esteroides/hormona tiroidea/ácido retinoico) o virus de mamífero (por  
20 ejemplo, promotor tardío de adenovirus; LTR de virus de cáncer de mama de ratón).

Los ejemplos del elemento de control de expresión incluyen un elemento que es activo en un tejido específico o tipos celulares, y tal elemento se denomina “elemento de control de expresión específico de tejidos”. En general, el  
25 elemento de control de expresión específico de tejidos es más activo en células específicas o tipos de tejidos, y esto es debido a que este elemento de control de expresión específico de tejidos es reconocido por una proteína activante de la transcripción que es activa en la célula específica o tipos de tejidos o por otro factor de transcripción, en comparación con otras células o tipos de tejidos. Los ejemplos específicos no limitantes de tal elemento de control de expresión son hexocinasa II, COX-2,  $\alpha$ -fetoproteína, antígeno carcinoembrionario, DE3/MUC1, antígeno específico de la próstata, C-erbB2/neu, polipéptido estimulante de la secreción de insulina dependiente de glucosa  
30 (GIP), transcriptasa inversa de telomerasa, y un promotor tal como un promotor sensible a hipoxia.

Se describe en la presente memoria una célula hospedante transformada o transfectada con ácido nucleico de IL-3R $\alpha$  o vector de la invención. Los ejemplos de las células hospedantes incluyen, pero no se limitan a, célula procarionota y célula eucariota, tal como células bacterianas, fúngicas (levadura), y células de plantas, insectos y  
35 animales (por ejemplo, mamíferos tales como primates, ser humano, y similar). Los ejemplos no limitantes de célula transformada incluyen una bacteria transformada con un ácido nucleico de bacteriófago recombinante, un vector de expresión de ácido nucleico plasmídico o vector de expresión de ácido nucleico cosmídico; una levadura transformada con un vector de expresión de levadura recombinante; una célula vegetal infectada con un vector de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformada con un vector de expresión plasmídico recombinante (por ejemplo, plásmido Ti); una célula de  
40 insecto infectada con un vector de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus); y una célula animal infectada con un vector de expresión de virus recombinante (por ejemplo, retrovirus, adenovirus, virus de la vacuna) o una célula de animal transformada manipulada para la expresión estable. La célula CHO es un ejemplo no limitante de una célula hospedante de mamífero que expresa un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  y su subsecuencia y fragmento. La célula hospedante puede ser una pluralidad o población de células a partir de una línea separada de la célula primaria, una célula secundaria aislada o célula subcultivada, o una estirpe celular establecida o cultivo celular inmortalizado.

La expresión “estar transformada” o “estar transfectada”, cuando se usa en referencia a una célula (por ejemplo, célula hospedante) o un organismo, significa un cambio de gen en una célula tras la incorporación de una molécula exógena, tal como una proteína o un ácido nucleico (por ejemplo, transgén), en la célula. En consecuencia, la célula “transfectada” o “transformada” es una célula en la que se introduce la molécula exógena manualmente por el  
50 hombre, por ejemplo, mediante técnicas de ADN recombinante, o una progenie de la misma.

El ácido nucleico o proteína se puede transfectar o transformar (expresar) en la célula o una progenie de la misma de forma estable o temporalmente. La proteína introducida se puede expresar haciendo crecer la célula, o transcribiendo el ácido nucleico. Puesto que existe una posibilidad de que se produzca una mutación durante la replicación, existen casos en los que una progenie de la célula transfectada o transformada no es idéntica a la célula precursora.  
60

En general, en la transfección o transformación celulares se usa un vector. El vector puede incluirse en una partícula vírica o vesícula, y puede ser dirigida opcionalmente hacia tipos celulares específicos incluyendo una proteína en la superficie de la partícula o vesícula que se une a un ligando o receptor de la célula diana. En consecuencia, una célula se puede usar como una diana preparando la propia partícula vírica o vesícula o la proteína de la superficie vírica, con el fin de transfectar o transformar *in vitro*, *ex vivo* o *in vivo*. En consecuencia, el vector incluye técnicas de suministro *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* de vectores víricos y no víricos a una célula, tejido u órgano.  
65

Además, la introducción de un ácido nucleico en una célula diana (por ejemplo, una célula hospedante) también se puede llevar a cabo mediante un método conocido convencionalmente en el campo técnico, tal como choque osmótico (por ejemplo, fosfato de calcio), electroporación, microinyección, fusión celular, y similar. La introducción de ácido nucleico y polipéptido *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* también se puede llevar a cabo usando otras técnicas. Por ejemplo, una sustancia polimérica tal como poliéster, ácido poliámico, hidrogel, polivinilpirrolidona, etileno-acetato de vinilo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa, sulfato de protamina, o copolímero de lactida/glicolida, copolímero de polilactida/glicolida, o copolímero de etileno-acetato de vinilo, y similar. El ácido nucleico se puede encerrar en una microcápsula de hidroximetilcelulosa o de gelatina, o en una microcápsula preparada usando poli(metacrilato de metilo), o en un sistema coloidal, respectivamente, mediante una técnica de coacervación o mediante polimerización interfacial. El sistema de dispersión coloidal incluye un sistema a base de un complejo polimérico, nanocápsula, microesfera, perlas y lípido (emulsión de tipo aceite en agua, micela, micela mixta, liposoma, y similar).

El liposoma para introducir diversas composiciones en células es conocido convencionalmente en el campo técnico, y se incluyen en él, por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, lipofectina y DOTAP (por ejemplo, patente US nº 4.844.904, patente US nº 5.000.959, patente US nº 4.863.740 y patente US nº 4.975.282; y GIBCO-BRL, Gaithersburg, Md.). También se conocen los lípidos catiónicos anfífilicos a base de piperazina, que son útiles en terapia génica (véase, por ejemplo, patente US nº 5.861.397). También se conoce un sistema lipídico catiónico (véase, por ejemplo, patente US nº 5.459.127). En esta memoria descriptiva, la sustancia polimérica, microcápsula y el sistema de dispersión coloidal (liposoma y similar) se denominan colectivamente como "vesícula".

Además, los ejemplos de las técnicas adecuadas que se pueden usar en el método para producir un anticuerpo son purificación por afinidad, purificación en gel no modificado, HPLC o RP-HPLC, exclusión por tamaños, purificación mediante columna de proteína A, y una combinación opcional de estas técnicas. Un isotipo de anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  se puede determinar usando un ensayo ELISA, y, por ejemplo, se puede identificar una Ig humana usando anti-Ig humana absorbido sobre Ig de ratón.

La afinidad de unión se puede determinar mediante constantes de asociación ( $K_a$ ) y de disociación ( $K_d$ ). La constante de afinidad en el equilibrio KD es la relación de  $K_a/K_d$ . Las constantes de asociación ( $K_a$ ) y de disociación ( $K_d$ ) se pueden medir usando resonancia plasmónica de superficie (SPR) (Rich y Myszka, Curr. Opin. Biotechnol., 11: 54 (2000); Englebienne, Analyst., 123: 1599 (1998)). La instrumentación y los métodos para la detección y monitorización en tiempo real de la constante de asociación son conocidos convencionalmente y están comercialmente disponibles (BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Suecia; y Malmqvist, Biochem. Soc. Trans., 27:335 (1999)). El valor de KD se puede definir como la concentración de anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  requerida para saturar la mitad del sitio de unión (50%) en IL-3R $\alpha$ .

#### (Propiedad de cruzamiento en primates)

Actualmente, aunque se están desarrollando en el mundo tantos como 500 anticuerpos terapéuticos, se afirma que los anticuerpos humanos tienen una posibilidad elevada de ser capaces de evitar problemas de inmunogenicidad. Sin embargo, por otro lado, existen muchos casos en los que la eficacia farmacéutica de los anticuerpos humanos no es mostrada en absoluto en roedores. En ese caso, hay muchos casos en los que se han de usar primates en ensayos de toxicidad, y además en muchos casos no es rara la reactividad encontrada solamente en el chimpancé. Cuando la reacción farmacológica se puede encontrar solamente en el chimpancé, el ensayo de toxicidad está adicionalmente constreñido de forma significativa. En primer lugar, las instalaciones en las que se pueden llevar a cabo experimentos con chimpancés están limitadas considerablemente, los individuos están infectados con VIH en muchos casos, y también hay problemas de higiene laboral de trabajadores implicados en los experimentos. Además, con respecto al chimpancé, hay grandes limitaciones por cuanto no se puede llevar a cabo el ensayo anatómico tras la administración final del fármaco, y también es imposible llevar a cabo el ensayo de toxicidad reproductivo, y similares. En consecuencia, la capacidad para verificar la eficacia farmacéutica en mono (*Macaca fascicularis* y/o *Macaca mulatta*) es útil desde el punto de vista de avanzar ensayos de toxicidad que son esenciales para el desarrollo de sustancias farmacéuticas.

Con respecto al método para confirmar la reactividad cruzada del mono con mono, se puede confirmar mediante un método convencionalmente conocido tal como el método de tinción tisular inmunoquímico, inmunoensayo enzimático en fase sólida (en lo sucesivo, "ELISA"), citometría de flujo (FCM), y similar.

#### (Composición farmacéutica)

Los anticuerpos se pueden incluir en una composición farmacéutica. Un anticuerpo puede comprender un vehículo farmacéuticamente aceptable, un estabilizante o una carga, y se prepara en forma de una disolución acuosa o como una preparación liofilizada. Típicamente, se usa una cantidad apropiada de una sal farmacéuticamente aceptable para la isotonicidad de la preparación farmacéutica. Los ejemplos del vehículo aceptable, estabilizante o carga incluyen una disolución tampón tal como fosfato, citrato y otro ácido orgánico, y similar; un polipéptido de bajo peso molecular (menos de 10 en el número de restos); una proteína tal como seroalbúmina, gelatina, inmunoglobulina, y similar; un polímero hidrófilo tal como polivinilpirrolidona; un aminoácido tal como glicina, glutamina, asparagina,

5 histidina, arginina, lisina, y similar; un monosacárido, disacárido y otros hidratos de carbono tales como glucosa, manosa, dextrina, y similar; un agente quelante tal como EDTA y similar; sacáridos tales como sacarosa, manitol, trehalosa, sorbitol, y similares; un contraión formador de sal tal como sodio y similar; un complejo metálico (por ejemplo, complejo de Zn-proteína); un antiséptico (cloruro de octadecil dimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de benzetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol, resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); y/o un tensioactivo no iónico tal como TWEEN™, PLURONICS™, polietilenglicol (PEG), y similar.

10 (Uso terapéutico de sustancia antitumoral que selecciona como diana a células que expresan IL-3R $\alpha$ )

10 Los ejemplos de las enfermedades para las que se examina el uso terapéutico, pero no se limitan a ellas, incluyen las enfermedades que se pueden considerar que se pueden tratar mediante la unión a o selección como diana de células tumorales de la sangre que expresan IL-3R $\alpha$  (célula de AML, célula de CML, célula de MDS, célula de ALL, célula de CLL, célula de mieloma múltiple, y similar), mastocito, basófilo, célula T cooperadora (por ejemplo, célula Th1, célula Th17), célula T reguladora (por ejemplo, célula CD4 positiva CD25 positiva), célula presentadora de antígeno (por ejemplo, célula dendrítica, monocito-macrófago y células relacionadas (célula estrellada hepática, osteoclasto, microglía, macrófago intraepidérmico, célula del polvo (fagocito alveolar) y similares)).

20 Los ejemplos de la enfermedad para la que se examina el uso terapéutico incluyen una enfermedad de la sangre en la que la expresión de IL-3R $\alpha$  se encuentra en médula ósea o sangre periférica. El ejemplo específico puede incluir leucemia mieloide aguda (AML). En base a la clasificación de FAB (criterios francés-americano-británico) que puede determinar qué etapa de la célula entre las células en el curso de la diferenciación en diversas células de la sangre a partir de la célula troncal hematopoyética provocó la transformación tumorigénica, la leucemia mieloide agua se clasifica en tipos de enfermedad de M0 (leucemia mieloblástica de tipo de microdiferenciación), M1 (leucemia mieloblástica no diferenciada), M2 (leucemia mieloblástica diferenciada), M3 (leucemia promielocítica aguda), M4 (leucemia mielomonocítica), M5 (leucemia monocítica), M6 (eritroleucemia), M7 (leucemia megacariocítica) y sus subtipos. Además, otros ejemplos de enfermedades incluyen leucemia linfocítica aguda, leucemia atípica, leucemia linfocítica crónica, leucemia de células T adultas, linfoma de células NK/T, linfocitosis granular (leucemia LGL), policitemia vera, trombocitemia esencial, síndrome hipereosinofílico, linfoma de Hodgkin, linfoma no de Hodgkin, linfoma folicular, linfoma MALT, linfoma de células del manto, linfoma de células B grandes difusas, linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico y enfermedad de Catsleman.

30 El uso de la invención, que comprende la administración o suministro de un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  y una sustancia antitumoral dirigida contra una célula que expresa IL-3R $\alpha$ , se puede llevar a cabo mediante cualquier método aceptable. En una realización específica, estos se administran a un sujeto, local, regional o sistémicamente.

35 Además, con respecto al anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ , la sustancia antitumoral dirigida contra la célula que expresa IL-3R $\alpha$  para tratar las enfermedades mencionadas anteriormente también se puede considerar que se combina con otro agente terapéutico adecuado para la misma enfermedad (típicamente un agente quimioterapéutico), o se puede administrar en combinación con radioterapia. Los ejemplos del otro agente terapéutico adecuado incluyen un agente quimioterapéutico tal como citarabina (Ara-C), un agente antitumoral del sistema de antraciclinas (típicamente, daunorrubicina (DNR), idarrubicina (IDA)), y similares, un agente terapéutico que induce diferenciación, tal como ácido todo-trans-retinoico (ATRA), ácido arsenioso, Am80 (tamibaroteno), gemtuzumab-ozogamicina (anticuerpo anti-CD33 conjugado con ozogamicina), topotecán, fludarabina, ciclosporina, mitoxantrona (MIT), interferón e imatinib, pero no se limitan a ellos, y también incluyen una combinación con un método terapéutico que se considera que es clínicamente eficaz.

40 En el sujeto que puede ser tratado por la invención se incluyen mamíferos (por ejemplo, ser humano). En una forma de realización específica, es un sujeto que es un candidato a un tumor de la sangre, o un sujeto que recibió tratamiento del tumor de la sangre, un sujeto que tiene la posibilidad de provocar una respuesta celular mediada por IL-3R $\alpha$ , o un sujeto que recibió tratamiento de la respuesta celular mediada por IL-3R $\alpha$ , un sujeto que es un candidato a un tumor maligno mielocítico, o un sujeto que recibió tratamiento del tumor maligno mielocítico, o un sujeto que es un candidato a leucemia mieloide aguda, o un sujeto que recibió tratamiento de la leucemia mieloide aguda.

50 Según la presente memoria, los términos “tratar”, “tratando”, “tratamiento” y sus variaciones gramaticales significan un protocolo, un plan, un procedimiento o un método mejorado que se lleva a cabo sobre cada sujeto del que es deseable obtener un efecto fisiológico o un buen resultado en el paciente. En consecuencia, la invención se refiere a un tratamiento y a un método de tratamiento que produce una mejora o efecto beneficioso medible, particularmente sobre un trastorno, una enfermedad, patología, un estado de una enfermedad o un síntoma de un sujeto dado. La mejora o efecto beneficioso medible es objetivo o subjetivo, desmesurado, transitorio o mejora a largo plazo de uno cualquiera de trastornos, enfermedades, patología, estados de una enfermedad o síntomas o una reducción en el comienzo, gravedad, duración o frecuencia de síntoma adverso relacionado con o provocado por trastornos, enfermedades, estados fisiológicos, patología o estado. Según la invención, existe la posibilidad de que su efecto no siempre se exhiba inmediatamente, sino que se encuentra una mejora o efecto beneficioso eventual un poco más

tarde con el transcurso del tiempo, de manera que se producirá la estabilización o mejoría en un sujeto dado.

Excepto que se señale de otro modo, todos los términos técnicos y términos científicos usados en esta memoria descriptiva tienen los mismos significados que aquellos que son generalmente evidentes para personas en el campo técnico al que se refiere la invención. En las operaciones o exámenes de la invención se pueden usar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta memoria descriptiva, pero aquellos que se describen en esta memoria descriptiva son métodos y materiales adecuados.

## EJEMPLOS

### Ejemplo 1 Preparación de célula de expresión de IL-3R $\alpha$ humana, de *Macaca fascicularis* o de *Macaca mulatta*

#### (Clonación molecular de ADNc de IL-3R $\alpha$ , y preparación de vector de expresión)

El ADNc de IL-3R $\alpha$  humana se amplificó a partir de un ADN derivado de célula sanguínea (CLONTECH Human MTC Panel) mediante PCR usando ExTaq (TAKARA BIO INC.). Como dispositivo de PCR, se usó GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, en lo sucesivo, el dispositivo de PCR es el mismo en esta memoria descriptiva). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, se llevó a cabo una reacción en tres etapas a 94°C 30 segundos-55°C 30 segundos-72°C 2 minutos, 40 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 99°C durante 30 segundos. Los cebadores de la PCR usados son como siguen.

IL-3R $\alpha$ \_Fw: 5'-CGGCAATTGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCAC-3' (SEC ID NO:3)

IL-3R $\alpha$ \_Re: 5'-ATTGCGGCCGCTCAAGTTTTCTGCACGACCT-3' (SEC ID NO:4)

Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se cortó una banda a alrededor de 1,2 kb y se extrajo usando JetSob (Genomed). El ADN extraído se digirió con *MfeI* y *NotI*, se mezcló con el vector pEGFP-N1 (Clontech) o con el vector pEF6/Myc-His que se había digerido con *EcoRI* y *NotI*, y se ligó usando el kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre placa de LB (que contiene kanamicina). La comprobación del inserto del vector pEGFP-N1 se llevó a cabo mediante PCR directa de la colonia usando LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 94°C 30 segundos-55°C 30 segundos-72°C 2 minutos, 40 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 99°C durante 30 segundos. Con respecto a los cebadores usados, se usaron IL-3R $\alpha$ -Fw e IL-3R $\alpha$ -Re.

Los productos de PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Usando una colonia a partir de la cual se obtuvo una amplificación a alrededor de 1,2 kb, se determinó una secuencia nucleotídica mediante un método de secuenciación directo. En la reacción de muestras de secuencias, se usaron BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) (éstos se usaron en todos los análisis de secuencias de ADN en la presente memoria). Con respecto a los cebadores, se usaron IL-3R $\alpha$ -Fw, IL-3R $\alpha$ -Re y el siguiente cebador. IL-3R $\alpha$ \_seqF1: 5'-GTCTTCACTACAAAACGGAT-3' (SEC ID NO:5).

Como el dispositivo de análisis de la secuencia, se usó el analizador de ADN ABI 3700XL (Applied Biosystems). Se seleccionó un clon que tiene la misma secuencia de la región codificante del número de asociación de GenBank NP-002174.1, y se extrajo un ADN plasmídico mediante un método Miniprep. Los nombres de los vectores fueron pEGFR-N1/hCD123 y pEF6/Myc-His/hCD123, respectivamente.

La secuencia del inserto (*MfeI* a *NotI*) fue como sigue.

```
CAATTGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCACGCTGCTCCTGATCGCCCTGCC
TGTCTCTGCAAACGAAGGAAGATCCAAACCCACCAATCACGAACCTAAGG
ATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTTAACAGAAATGTGACC
GATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAG
CTATTGCCAGTTTGGAGCAATTTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCC
GAGTGGCCAACCCACCATTCTCCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTGG
```

GAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGACCTGCTGGATTTCATGACGTGGAT  
 TTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCCGGGGGCCCCCGCGGACGTCCAG  
 TACGACCTGTACTTGAACGTTGCCAACAGGCGTCAACAGTACGAGTGTCTTC  
 ACTACAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTCTTTTCGATGACAT  
 CTCTCGACTCTCCAGCGGTTCTCAAAGTTCCCACATCCTGGTGCGGGGCAGG  
 AGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACAGATAAGTTTGTCTCTTTTTCACAGAT  
 TGAGATATTAACCTCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAATAAGACACATTCTT  
 TTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTTCGCTATGAGCTT  
 CAGATACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTCAGAGACAGA  
 ACCTCCTTCCAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCC  
 GGGAAAGAGTGTATGAATTCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGA  
 GTGCGACCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGCCTGGCGGACGTGCTGCTGCT  
 GATCGCGCTGGGGACGCTGCTGGCCCTGGTCTGTGTCTTCGTGATCTGCAGA  
 AGGTATCTGGTGTGATGCAGAGACTCTTCCCCGCATCCCTCACATGAAAGACC  
 CCATCGGTGACAGCTTCCAAAACGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCGGGCA  
 AAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTACTGAAGTACAGGTCGTGCAGAAAA  
 CTTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO:6)

Las muestras de ADNc de *Macaca fascicularis* y *Macaca mulatta* se amplificaron a partir de un ADNc derivado de médula ósea de *Macaca fascicularis* o ADNc derivado de médula ósea de *Macaca mulatta*, mediante un método de PCR usando LA Taq (TAKARA BIO INC). Como el dispositivo de PCR, se usó el GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 70 segundos, 40 ciclos, y entonces se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Las subsecuencias se obtuvieron a través de la recuperación mediante BLAST de la base de datos pública del genoma de *Macaca mulatta* (<http://www.hgsc.bnm.tmc.edu/blast.hgsc>), en base a la secuencia de ADNc de hIL-3R $\alpha$  para diseñar los cebadores. Las secuencias de cebadores usadas fueron las siguientes.

Rhe123Fw1:CGGCAATTGCCACCATGACCCTCCTTTGGCTGACGCTG (SEC ID NO:7)

15 Rhe123Rv1:TATATTGCGGCCGCTCAAGTTTCTCCACCACCTGCAC (SEC ID NO:8)

Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se cortó una banda a alrededor de 1,2 kb, y el ADN se extrajo usando Gel Extraction Kit (QIAGEN). El ADN así extraído se mezcló con el vector pGEM-T Easy (Promega) y se ligó usando kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre placa de LB (que contiene ampicilina). La comprobación del inserto del vector pGEM-T Easy se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias usando LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 1 minuto, 35 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 72°C durante 2 minutos. Como los cebadores, se usaron los siguientes.

T7: TAATACGACTCACTATAGGG (SEC ID NO:9)

30 SP6: GATTTAGGTGACACTATAG (SEC ID NO: 10)

Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Usando una colonia a partir de la cual se obtuvo una amplificación a alrededor de 1,2 kb, la secuencia nucleotídica se determinó mediante un método de secuenciación directa. Como los cebadores de PCR, se usaron T7 y SP6. Se seleccionó un clon que no muestra mutación mediante PCR, y su ADN plasmídico se extrajo mediante el método Miniprep. El ADN así obtenido se digirió con *MfeI* y *NotI*, se mezcló con el vector pEGFP-N1 (Clontech) que se había escindido con *EcoRI* y *NotI* y se ligó usando kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre placa de LB (que contiene kanamicina).

40 La comprobación del inserto del vector pEGFP-N1 se llevó a cabo mediante una PCR directa de colonias usando LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 94°C 30 segundos-55°C 30 segundos-72°C 2 minutos, 40

ciclos, y después se llevó a cabo una reacción a 99°C durante 30 segundos. Con respecto a los cebadores de PCR usados, se usaron Rhe123Fw1 y Rhe123Rv1.

5 Los productos de PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Usando una colonia a partir de la cual se obtuvo una amplificación a alrededor de 1,2 kb, se determinó una secuencia nucleotídica mediante un método de secuenciación directo. En la reacción de muestras de secuencias, se usaron BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) (éstos se usaron en todos los análisis de secuencias de ADN en esta memoria descriptiva). Como los cebadores, se usaron Rhe123Fw1 y  
10 Rhe123Rv1. Los vectores se denominaron pEGFR-N1/cyCD123 y pEGFR-N1/rhCD123, respectivamente.

La secuencia del inserto (*MefI* a *NotI*) de IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis* fue como sigue.

CAATTGCCACCATGACCCTCCTTTGGCTGACGCTGCTCCTGGTCGCCACGCC  
 CTGTCTCCTGCAAACGAAGGAGGATCCAAATGCACCAATCAGGAATCTAAGG  
 ATGAAAGAAAAGGCTCAGCAGTTGATGTGGGACCTGAACAGAAACGTGACC  
 GACGTGGAGTGTATCAAAGGCACCGACTATTCTATGCCGGCAATGAACAACA  
 GCTATTGCCAGTTCGGAGCCATTTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTC  
 CGAGTGGCCAGTCCCCGTTCTCCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTG  
 GGACGCCTCAGGCAGGCGCGGAGAATCTGACCTGCTGGGTTTCATGACGTGG  
 ATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGTGGCAGGCCCGGCGGCCCCCGCTGACGTCCA  
 GTACGACCTGTACTTGAACAATCCCAACAGCCACGAACAGTACAGGTGCCTT  
 CACTACAAAACGGATGCTCGGGGAACACAGATCGGGTGTCTGGTTCGATGACA  
 TCGCTCGACTCTCCCGCGGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGAGGGGCAG  
 GAGCGCAGCCGTCAGTATCCCCTGCACAGATAAGTTTGTCTTCTTTTCACAGA  
 TTGAGAGATTAACCTCCACCCAACATGACTGGAGAGTGTAATGAGACACATTC  
 CTTTATGCACTGGAAAATGAAAAGTCATTTCAATCGCAAATTCGGCTATGAGC  
 TTCGGATCCAAAAGAGAATGCAGCCTGTAAGGACAGAACAGGTCAGAGACA  
 CAACCTCCTTCCAGCTACCCAATCCTGGAACGTACACAGTGCAAATAAGAGC  
 CCGGGAACAGTGTATGAATTCTTGAGTGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTC  
 GAGTGCGACCAGGAGGAGGGCGCGAGCTCGCGTGCCTGGCGGACGTCGCTG  
 CTGATCGCGCTGGGGACGCTGCTGGCCTTGCTCTGTGTGTTCCCTCATCTGCAG  
 AAGGTATCTGGTGATGCAGAGGCTGTTTCCCCGCATCCACACATGAAAGAC  
 CCCATCGGTGACACCTTCCAACAGGACAAGCTGGTGGTCTGGGAGGCGGGC  
 AAAGCCGGCCTGGAGGAGTGTCTGGTGTCTGAAGTGCAGGTGGTGGAGAAA  
 ACTTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO:11)

15 La secuencia del inserto (*MefI* a *NotI*) de IL-3R $\alpha$  de *Macaca mulatta* fue como sigue

CAATTGCCACCATGACCCTCCTTTGGCTGACGCTGCTCCTGGTCGCCACGCC  
 CTGTCTCCTGCAAACCAAGGAGGATCCAAATGCACCAATCAGGAATCTAAGG  
 ATGAAAGAAAAGGCTCAGCAGTTGATGTGGGACCTGAACAGAAACGTGACC  
 GACGTGGAGTGTATCAAAGGCACCGACTATTCTATGCCGGCAATGAACGACA  
 GCTATTGCCAGTTCGGAGCCATTTCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTC  
 CGAGTGGCCAGTCCCGTTCTCCACGTGGATCCTCTTCCCTGAGAACAGTG  
 GGACGCCTCGGGCAGGCGCGGAGAATTTGACCTGCTGGGTTTCATGACGTGG  
 ATTTCTTGAGCTGCAGCTGGGTGGTAGGCCCGGCGGCCCCCGCTGACGTCCA  
 GTACGACCTGTACTTGAACAATCCCAACAGCCACGAACAGTACAGGTGCCTT  
 CGCTACAAAACGGATGCTCGGGGAACACAGATCGGGTGTCTGGTTCGATGACA  
 TCGCTCGACTCTCCCGCGGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGAGGGGCAG

(Preparación de estirpe celular de expresión forzada de IL-3R $\alpha$ )

5 La célula L929 (fabricada por ATCC) y la célula Colon-26 (fabricada por ATCC) se infectaron con el vector pEGFP-N1/hCD123 o el vector pEF6/Myc-His/hCD123 usando electroporación (BTX). Específicamente, se mezclaron 10 a 20  $\mu$ g de ADN con cien mil células, y se dejó reaccionar a 300 V y 950  $\mu$ F. Con respecto a las células, se seleccionaron células multirresistentes usando neomicina (Calbiochem) para pEGFP-N1/hCD123 o blasticidina (Invitrogen) para pEF6/Myc-His/hCD123. Con respecto a las células así seleccionadas, una célula positiva para GFP, o una célula que expresa en gran cantidad IL-3R $\alpha$  (CD123), se seleccionó adicionalmente mediante clasificación usando citometría de flujo (FAC SVantage, FACSAria y similar, BD Biosciences), y se denominó como L929/hCD123 y Colon-26/hCD123, respectivamente.

10 Con respecto a la preparación de células de expresión forzada de IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis* y de *Macaca mulatta*, éstas también se prepararon usando L929 y Colon-26 de la misma manera como en el caso de la célula de expresión forzada de IL-3R $\alpha$  humana, y se denominaron L929/cyCD123, Colon-26/cyCD123, L929/rhCD123 y Colon-26/rhCD123.

### Ejemplo 2 Preparación de forma soluble de región extracelular de IL-3R $\alpha$

20 (Preparación de forma soluble de vector de expresión de región extracelular de IL-3R $\alpha$  humana)

Un ADNc que codifica la región extracelular de IL-3R $\alpha$  humana se amplificó mediante un método de PCR, y se le conectó una etiqueta FLAG al mismo en dirección 3'. Específicamente, el ADNc que codifica la región extracelular de IL-3R $\alpha$  humana se amplificó mediante PCR usando el ADN plasmídico de pEF6/Myc-His/hCD123 como molde, y usando Platinum Pfu polymerase (Invitrogen). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 96°C durante 2 minutos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 96°C 20 segundos-55°C 30 segundos-68°C 65 segundos, 30 ciclos. Los cebadores usados fueron IL-3R $\alpha$ -Fw y el siguiente cebador.

30 hIL-3R $\alpha$ sol-FLAG-NotI: 5'-

**ATTGCGGCCGCTCACTTATCGTCGTCATCCTTGTAAGTCCCGCCAGGCACGTGT  
GTTTG-3' (SEQ ID NO:13)**

Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. El ADN se extrajo usando JetSorb (Genomed). El ADN así purificado se digirió con *MfeI* y *NotI*, y nuevamente se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). Se cortó una banda de alrededor de 1,0 kb, y el ADN se extrajo usando JetSorb (Genomed). El ADN obtenido se mezcló con un vector pTracer-CMV/Bsd, que se había escindido usando las mismas enzimas del ADN purificado, y se ligó usando kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, la muestra de ligación y una célula competente DH10B se mezclaron y se extendieron sobre placa de LB (que contiene ampicilina). La comprobación del inserto se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias usando LA Taq (Takara Shuzo Co., Ltd.). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 40 segundos, 35 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de la PCR usados fueron IL-3R $\alpha$ -Fw e IL-3R $\alpha$ sol-FLAG-NotI.

45 Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Un ADN plasmídico se extrajo mediante el método Miniprep a partir de una colonia en la que se obtuvo una amplificación de aproximadamente 1,0 kb. Se encontró mediante un análisis de secuencia de ADN que el ADN plasmídico purificado tiene la secuencia idéntica a la región correspondiente que el número de acceso de GenBank NP-002174.1.

La secuencia del inserto (*MfeI* a *NotI*) fue como se expone a continuación.

**CAATTGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCACGCTGCTCCTGATCGCCCTGCCC  
TGTCTCCTGCAAACGAAGGAAGATCAAACCCACCAATCACGAACCTAAGG  
ATGAAAGCAAAGGCTCAGCAGTTGACCTGGGACCTTAACAGAAATGTGACC  
GATATCGAGTGTGTTAAAGACGCCGACTATTCTATGCCGGCAGTGAACAATAG  
CTATTGCCAGTTTGGAGCAATTCCTTATGTGAAGTGACCAACTACACCGTCC  
GAGTGGCCAACCCACCATTCACCGTGGATCCTCTCCCTGAGAACAGTGG  
GAAGCCTTGGGCAGGTGCGGAGAATCTGACCTGCTGGATTGACGCTGGAT**

TTCTTGAGCTGCAGCTGGGCGGTAGGCCCGGGGGCCCCCGCGGACGTCCAG  
TACGACCTGTACTTGAACGTTGCCAACAGGCGTCAACAGTACGAGTGTCTTC  
ACTACAAAACGGATGCTCAGGGAACACGTATCGGGTGTCTTCGATGACAT  
CTCTCGACTCTCCAGCGGTTCTCAAAGTTCCACATCCTGGTGCGGGGCAGG  
AGCGCAGCCTTCGGTATCCCCTGCACAGATAAGTTTGTCTCTTTTACAGAT  
TGAGATATTAACCCACCCAACATGACTGCAAAGTGTAATAAGACACATTCTT  
TTATGCACTGGAAAATGAGAAGTCATTTCAATCGCAAATTTTCGCTATGAGCTT  
CAGATACAAAAGAGAATGCAGCCTGTAATCACAGAACAGGTCAGAGACAGA  
ACCTCCTTCCAGCTACTCAATCCTGGAACGTACACAGTACAAATAAGAGCCC  
GGGAAAGAGTGTATGAATCTTGAGCGCCTGGAGCACCCCCCAGCGCTTCGA  
GTGCGACCAGGAGGAGGGCGCAAACACACGTGCCTGGCGGGACTACAAGG  
ATGACGACGATAAGTGAGCGGCCGC (SEQ ID NO:14)

(Preparación de forma soluble de proteína IL-3R $\alpha$  humana)

- 5 El ADN plasmídico del vector de expresión de pTracer CMV que contiene la forma soluble de la secuencia de IL-3R $\alpha$  se purificó usando QIAGEN Plasmid Maxi Kit. Como célula hospedante para la expresión, se usó una célula CHOras1. La célula CHOras1 se cultivó con agitación usando medio SFM II (Invitrogen) (37°C, 5% de CO<sub>2</sub>).

10 En la introducción génica se usó un método de PEI. Se pesó polietilenimina, lineal, MW 25.000 (Polysciences) y se disolvió en PBS mientras se ajusta a pH de alrededor de 7,0 con HCl (1 g/l). La disolución obtenida se agitó durante 1 hora, y después se esterilizó filtrando a través de un filtro de membrana que tiene un tamaño de poros de 0,22  $\mu$ m, MILLEX-GV (Millipore). Después, se mezcló 1 mg del ADN plasmídico purificado con 20 ml de Opti-Pro SFM (Invitrogen) para obtener la Disolución A. La Disolución B se preparó mezclando 2,5 ml de disolución de PEI (1 g/l) con 20 ml de Opti-Pro SFM (Invitrogen). Después de que la Disolución A y la Disolución B se mezclaron, y después  
15 se dejó reposar durante 10 minutos, la disolución obtenida se añadió a células CHOras1 (1.000.000 células por 1 ml). Después de seis días, el sobrenadante celular se recuperó y se usó para la purificación de la proteína.

La purificación de la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  humana se llevó a cabo mediante el siguiente método. Un  
20 sobrenadante de cultivo que contiene la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  se recuperó mediante centrifugación 6 días después de la introducción del gen, y se hizo pasar a través de un filtro. La disolución obtenida se diluyó 5 veces con disolución salina tamponada con Tris (TBS), se preparó una columna Anti-FLAG usando anti-FLAG M2 Agarose Affinity Gel (Sigma), y se le aplicó la disolución usando HiLoad Pump P-50 (Pharmacia Biotech). La elución se llevó a cabo usando el péptido FLAG (Sigma) y según el manual. El eluato se fraccionó en varias fracciones, cada  
25 fracción se sometió a SDS-PAGE (gel en gradiente MultiGel II Mini 10/20%; Cosmo Bio Co., Ltd.) bajo una condición reductora, y entonces se llevó a cabo la tinción con plata y la transferencia Western. Para la tinción con plata se usó un reactivo de tinción con plata "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Para la transferencia Western se usó anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma) y un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Una fracción en la que se encontró la proteína de interés se concentró usando Amicon Ultra-4 10K (Millipore), y se llevó a cabo la cromatografía por filtración en gel usando Superdex 200 gp (GE Healthcare).  
30 Después del fraccionamiento, cada fracción se sometió a SDS-PAGE (gel en gradiente MultiGel II Mini 10/20%; Cosmo Bio Co., Ltd.) bajo condición reductora, y entonces se llevó a cabo la tinción con plata y la transferencia Western. En la tinción con plata se usó un reactivo de tinción con plata "Daiichi" (Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). En la transferencia Western se usó anticuerpo anti-FLAG M2 (Sigma) y un anticuerpo anti-inmunoglobulina de ratón de conejo marcado con fosfatasa alcalina. Una fracción en la que se encontró la proteína de interés se concentró  
35 usando Amicon Ultra-4 10K (Millipore), y se lavó con PBS. Al llevar a cabo la esterilización mediante filtración usando un filtro de membrana MILLEX-GV (Millipore) que tiene un tamaño de poros de 0,22  $\mu$ m, se obtuvo una forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  humana. Como resultado de la prueba de Limulus usando Limulus ES-II Kit Wako (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), no se detectó endotoxina. Con respecto a la concentración de la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  humana, se midió la absorbancia a 280 nm y se calculó 1 mg/ml como 1,4 OD.  
40

### **Ejemplo 3 Preparación de anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$ humana usando ratón productor de anticuerpo humano**

(Ratón productor de anticuerpo humano)

45 El ratón usado en la inmunización tiene un antecedente genético de homocigoto tanto en las interrupciones de la cadena pesada de Ig como de la cadena ligera  $\kappa$  endógenas, y también mantiene simultáneamente el fragmento cromosómico 14<sup>o</sup> que contiene el locus de cadena pesada de Ig humana (SC20) y el transgén de cadena  $\kappa$  de Ig

humana (KCo5). Este ratón se preparó cruzando un ratón de línea A que tiene el locus de cadena pesada de Ig humana en un ratón de línea B que tiene el transgén de cadena  $\kappa$  de Ig humana. La línea A es un homocigoto tanto en las interrupciones de cadena pesada de Ig como de cadena ligera  $\kappa$  endógenas, es una línea de ratón que mantiene el fragmento cromosómico 14<sup>o</sup> (SC20) que se puede transmitir a la progenie, y se describe por ejemplo en un documento de Tomizuka et al. [Tomizuka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000, Vol. 97: 722]. También, la línea B es un homocigoto tanto en las interrupciones de cadena pesada de Ig como de cadena ligera  $\kappa$  endógenas, es una línea de ratón (ratón transgénico) que mantiene un transgén de cadena  $\kappa$  de Ig humana (KCo5), y se describe en un documento por Fishwild et al. [Nat. Biotechnol (1996), 114: 845].

En el siguiente ensayo inmune se usó un individuo en el que se detectaron simultáneamente cadena pesada de Ig humana y cadena ligera  $\kappa$  en suero, obtenido cruzando un ratón macho de línea A en un ratón hembra de línea B, o cruzando un ratón hembra de línea A en un ratón macho de línea B [Ishida y Lonberg, IBC's 11th Antibody Engineering, Abstract 2000]. A este respecto, el ratón productor de anticuerpo humano mencionado anteriormente (denominado ratón KM) se puede obtener de Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd. mediante un contrato.

(Preparación de anticuerpo monoclonal humano frente a IL-3R $\alpha$  humana)

Con respecto a la preparación del anticuerpo monoclonal en este ejemplo, se preparó según un método general descrito en A Guide to Monoclonal Antibody Experimental Operations (escrito en japonés) (editado por Tamie Ando et al. publicado por Kodansha, 1991) y similar. Para la IL-3R $\alpha$  como inmunógeno, se usó una célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  (CCL-1, ATCC), una célula Colon-26 que expresa IL-3R $\alpha$  (Cell Resource Center for Biomedical Research Institute of Development, Aging y Cancer Tohoku University), o una forma soluble de la proteína de fusión de IL-3R $\alpha$  humana con Fc. Como animal a inmunizar, se usó el ratón KM mencionado anteriormente.

Con el fin de preparar anticuerpo monoclonal humano frente a IL-3R $\alpha$  humana, el ratón KM se inmunizó con la célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  humana o con la célula Colon-26 que expresa IL-3R $\alpha$  humana preparada en el ejemplo 1, intraperitonealmente a una dosis de  $1 \times 10^7$  células/animal cada 1 semana a 2 semanas durante un total de 4 veces. Tres días antes de la extracción del bazo que se describe más abajo, se administraron 20  $\mu\text{g}$ /ratón de la forma soluble de la proteína soluble IL-3R $\alpha$  humana a través de la vena caudal.

Después de que el bazo se obtuvo quirúrgicamente del ratón inmunizado, el bazo se colocó en PBS y se troceó en una malla (cell strainer, FALCON) usando un émbolo de jeringuilla. Después de que la suspensión celular se hizo pasar a través de la malla y se centrifugó, las células precipitadas obtenidas se resuspendieron en Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma). Después de 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se le añadió medio DMEM libre de suero (Invitrogen) que contiene 350 mg/ml de bicarbonato de sodio, 50 unidades/ml de penicilina y 50  $\mu\text{g}$ /ml de estreptomycin (en adelante denominado "medio DMEM libre de suero"), para precipitar las células. El número de células se midió suspendiéndolas nuevamente en el medio DMEM libre de suero.

Por otro lado, una célula de mieloma SP2/0 (ATCC No. CRL-1581) se cultivó a 37°C en presencia de dióxido de carbono al 5% usando medio DMEM (Invitrogen) que contiene 10% de FCS (Invitrogen), 50 unidades/ml de penicilina y 5  $\mu\text{g}$ /ml de estreptomycin (en lo sucesivo denominado "medio DMEM que contiene suero"). Las células SP2/0 se lavaron con medio DMEM libre de suero. De la misma manera, las células se suspendieron en medio DMEM libre de suero para medir el número de células. Después de que la suspensión de las células derivadas de bazo recuperadas y una suspensión del mieloma de ratón se mezclaron a una relación numérica de células de 5:1, la suspensión mixta se centrifugó, y después el sobrenadante se eliminó completamente. Como agente de fusión, se añadió lentamente polietilenglicol 1500 (Boehringer-Mannheim) al 50% (p/v) al sedimento obtenido mientras se agitaba el sedimento con la punta de una pipeta, y después se le añadió lentamente medio DMEM libre de suero calentado previamente hasta 37°C. Además, se le añadió lentamente una cantidad apropiada de medio DMEM libre de suero. Después, la disolución obtenida se dejó reposar a 37°C durante 5 minutos en presencia de dióxido de carbono al 5%. Tras centrifugar, el sobrenadante se eliminó, y las células fusionadas así obtenidas se suspendieron en medio DMEM (Invitrogen) que contiene 10% de FCS (Invitrogen), penicilina-estreptomycin-glutamina (Sigma), IL-6 (5 ng/ml) y 2-mercaptoetanol (Invitrogen) (en adelante, denominado "medio DMEM que contiene IL-6"), y se cultivaron a 37°C en presencia de dióxido de carbono al 5%. Al día siguiente, las células se recuperaron pipeteando, y se hicieron precipitar mediante centrifugación. El sedimento celular obtenido se resuspendió en medio DMEM que contiene IL-6. Las células suspendidas se sometieron a dilución limitante en una placa de 96 pocillos y se cultivaron durante alrededor de 7 días a 14 días. El sobrenadante de cultivo se usó en la identificación de hibridomas descrita en el siguiente ejemplo.

(Identificación de hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano que se une a IL-3R $\alpha$  humana)

La identificación del hibridoma se llevó a cabo usando el sobrenadante celular preparado en el ejemplo anterior. Brevemente, el método se llevó a cabo mediante citometría de flujo, en la que se usó una estirpe celular que expresa de forma estable IL-3R $\alpha$  humana.

Específicamente, una combinación de célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  humana y de la estirpe celular precursora de

la célula L929, o una combinación de célula Colon-26 que expresa IL-3R $\alpha$  humana y la célula Colon-26 de la estirpe celular precursora, se mezcló con el sobrenadante de hibridoma y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar las células obtenidas dos veces con un medio de tinción (PBS de Dulbecco que contiene 2% de suero fetal de ternera, 2 mM de EDTA, 0,05% de NaN<sub>3</sub>), se le añadió Anti-IgG humana F(ab')<sub>2</sub> de cabra-PE (Southern Biotech) como anticuerpo secundario y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con el medio de tinción, las células obtenidas se analizaron mediante FACSCalibur (BD Biosciences). Se recogió un hibridoma que reaccionó solamente con la célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  humana.

El hibridoma seleccionado se sometió a dilución limitante, y la identificación se llevó a cabo usando su sobrenadante de cultivo. Específicamente, cada una de la célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  humana y la célula L929 de la estirpe celular precursora se mezcló con el sobrenadante de hibridoma y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con el medio de tinción, se le añadió anti-kappa humana F(ab')<sub>2</sub> de cabra-PE (Dako) como anticuerpo secundario, y se dejó reposar a 4°C durante 30 minutos. Después de lavar dos veces con el medio de tinción, las células se analizaron mediante FACSCalibur (BD Biosciences). Se recogió un hibridoma que reaccionó solamente con la célula L929 que expresa IL-3R $\alpha$  humana.

#### **Ejemplo 4 Preparación de anticuerpo humano recombinante anti-IL-3R $\alpha$ humana**

(Obtención de un gen de anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  humana a partir del hibridoma, y preparación de vector de expresión)

A partir del hibridoma obtenido en el ejemplo 3, los clones denominados Old4, Old5, Old7, Old19, New102 y Old6 se cultivaron usando medio eRDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.) que contiene 10 ng/ml de IL-6 (R & D Systems) y 10% de suero fetal bovino (SIGMA), y después las células se recogieron mediante centrifugación. A las células obtenidas, y entonces se añadió TRIZOL (GIBCO), y se extrajo ARN total según las instrucciones. La clonación de la región variable del ADNc del anticuerpo se llevó a cabo usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), según las instrucciones anejas al mismo.

Además, la región variable se clonó a partir de un hibridoma ATCC, HB12009, que produce un anticuerpo de ratón 7G3 anti-IL-3R $\alpha$  humana, y se usó como control. Conectando el ADNc así obtenido con un ADN que codifica la región constante de IgG1 humana, se preparó un vector de expresión de anticuerpo quimérico. Específicamente, las células se recogieron mediante centrifugación a partir del hibridoma crioconservado, y entonces se les añadió TRIZOL (GIBCO) para extraer ARN total según las instrucciones. La clonación de la región variable del ADNc del anticuerpo se llevó a cabo usando cebadores específicos del anticuerpo IgG de ratón, además del kit de amplificación de ADNc SMART RACE (Clontech), según las instrucciones adjuntas al mismo.

Usando 5  $\mu$ g del ARN total como molde, se preparó el ADNc de 1ª hebra.

##### 1) Síntesis del ADNc de 1ª hebra

ARN total 5  $\mu$ g/3  $\mu$ l

5'CDS 1  $\mu$ l

SMART oligo 1  $\mu$ l

Después de que la mezcla de reacción que comprende las composiciones anteriores se incubó a 72°C durante 2 minutos, se añadieron

5x tampón 2  $\mu$ l

DTT 1  $\mu$ l

Mezcla de DNTP 1  $\mu$ L y

SuperscriptII 1  $\mu$ l

a la mezcla de reacción, y se incubó a 42°C durante 1,5 horas.

A la mezcla obtenida, se le añadieron adicionalmente 100  $\mu$ l de tampón de Tricina, y se incubó a 72°C durante 7 minutos.

2) Amplificación del gen de cadena pesada y del gen de cadena ligera mediante PCR, y construcción del vector de expresión de anticuerpo recombinante

Para la amplificación de ADNc, se usó Z-Taq fabricado por Takara.

- 5           ADNc 2 µl
- 10x tampón de Z-Taq 5 µl
- 10       mezcla de dNTP 4 µl
- Z-Taq 1 µl
- Cebador 1
- 15       Cebador 2

Una disolución de reacción que comprende la composición mencionada anteriormente se ajustó hasta un volumen final de 50 µl con agua redestilada, para ser sometida a PCR.

- 20       Para la amplificación de la cadena pesada, se usaron UPM (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador hh-6 (5'-GGTCCGGGAGATCATGAGGGTGCCTT-3') (SEC ID NO:15), y un ciclo de reacciones de 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 30 veces. Además, usando como molde 1 µl de la disolución de reacción obtenida, y usando como cebadores NUP (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador hh-3 (5'-GTGCACGCCGCT GGT CAGGGCGCCTG-3') (SEC ID NO:16), un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 20 veces. Después, los productos de la PCR amplificados se purificaron usando el kit de purificación mediante PCR (QIAGEN), y se determinaron las secuencias nucleotídicas usando como cebador hh-4 (5'-GGT GCC AGG GGG AAG ACC GAT GG-3') (SEC ID NO: 17). Los siguientes cebadores específicos se sintetizaron en base a la información de secuencia, y las secuencias también se determinaron desde la dirección opuesta usando los siguientes cebadores.

Cebador Fw específico de la cadena pesada de Old4

(5'-AGAGAGAGAGGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTG T  
-3') (SEQ ID NO:18)

35       Cebador Rv específico de la cadena pesada de Old4

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3') (SEC ID NO:19)

40       Cebador Fw específico de la cadena pesada de Old5

(5'-AGAGAGAGAGGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTG T  
-3') (SEQ ID NO:20)

45       Cebador Rv específico de la cadena pesada de Old5

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAAGAGACGGTGACCATTGTCCC-3') (SEC ID NO:21)

Cebador Fw específico de la cadena pesada de Old17

50       (5'-AGAGAGAGAGGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTG T  
-3') (SEQ ID NO:22)

Cebador Rv específico de la cadena pesada de Old17

55       (5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACAAGGGTTCCC-3') (SEC ID NO:23)

Cebador Fw específico de la cadena pesada de Old19

(5'-AGAGAGAGAGGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCT TTG T  
-3') (SEQ ID NO:24)

Cebador Rv específico de la cadena pesada de Old19

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC -3') (SEC ID NO:25)

5

Cebador Fw específico de la cadena pesada de New102

(5'-AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTG T  
-3') (SEQ ID NO:26)

10

Cebador Rv específico de la cadena pesada de New102

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTT-3') (SEC ID NO:27)

Cebador Fw específico de la cadena pesada de Old6

15

(5'-AGAGAGAGAGGTCGACCCACCATGGAAGTGGGCTCCGCTG-3') (SEC ID NO:28)

Cebador Rv específico de la cadena pesada de Old6

20

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGAGGAGACGGTGACCAGGGTTC-3') (SEC ID NO:29)

Para la amplificación de la cadena pesada del anticuerpo 7G3 de ratón, se usaron UPM (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador mH-Rv1 (5'-ATTTTG TCG ACC KYG GTS YTG CTG GCY GGGTG-3') (SEC ID NO:30), y un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 30 veces. Además, usando como molde 1 µl de esta disolución de reacción y usando NUP (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador mH-Rv2 (5'-GCACACYRCTGGACAGGGATCCAGAGTTCC-3') (SEC ID NO:31), un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 20 veces. Después, los productos de la PCR amplificados se purificaron usando el kit de purificación mediante PCR (QIAGEN), y la secuencia nucleotídica de la región variable de cadena pesada se determinó usando como cebador el cebador mH-Rv2 (SEC ID NO:31). Los siguientes cebadores específicos se sintetizaron en base a la información de secuencia, y las secuencias también se determinaron desde el sentido opuesto usando los siguientes cebadores.

25

30

Cebador Fw específico de la cadena pesada de 7G3

35

(5'-AGAGAGAGAGGTCGACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTC-3') (SEC ID NO:32)

Cebador Rv específico de la cadena pesada de 7G3

40

(5'-AGAGAGAGAGGCTAGCTGCAGAGACAGTGACCAGAGTCCC-3') (SEC ID NO:33)

La PCR se llevó a cabo usando los cebadores específicos mencionados anteriormente (98°C 1 segundo, 60°C 30 segundos, 72°C 30 segundos), y el fragmento de ADNc procedente de la amplificación de la cadena pesada se digirió con *Sall* y *NheI* y se insertó en el vector N5KG1-Val Lark [un vector modificado de N5KG1 (documento US 6.001.358, Idec Pharmaceuticals)], que se había escindido con las mismas enzimas. Determinando la secuencia usando como molde el vector, se encontró que la secuencia insertada es idéntica a la determinada mediante secuencia directa.

45

La cadena ligera se amplificó usando UPM (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador hk-2 (5'-GTT GAAGCT CTT TGT GAC GGG CGA GC-3') (SEC ID NO:34) y repitiendo 30 veces un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos. Además, usando como molde 1 µl de esta disolución de reacción y usando NUP (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y hk-6 (5'-TGGCGGGAAGATG AAG ACA GAT GGT G-3') (SEC ID NO:35), un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 20 veces. Después, los productos de la PCR amplificados se purificaron usando el kit de purificación mediante PCR (QIAGEN), y la secuencia nucleotídica se determinó usando el cebador hk-6. Los siguientes cebadores específicos se sintetizaron en base a la información de secuencia, y las secuencias también se determinaron desde la dirección opuesta.

50

55

Cebador Fw específico de la cadena ligera de Old4

60

(5'-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCC CCG CTC AGC-3') (SEC ID NO:36)

Cebador Rv específico de la cadena ligera de Old4

(5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCC CCT G-3') (SEC ID NO:37)

5 Cebador Fw específico de la cadena ligera de Old5

(5'-AGA GAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCG CTC AGC-3') (SEC ID NO:38)

Cebador Rv específico de la cadena ligera de Old5

10 (5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCC CCT G-3') (SEC ID NO:39)

Cebador Fw específico de la cadena ligera de Old17

15 (5'-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCC TCG CTC AG-3') (SEC ID NO:40)

Cebador Rv específico de la cadena ligera de Old17

20 (5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGGTCC CCT G-3') (SEC ID NO:41)

Cebador Fw específico de la cadena ligera de Old19

(5'-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCC TCG CTC AG-3') (SEC ID NO:42)

25 Cebador Rv específico de la cadena ligera de Old19

(5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATTTCACCTTGGTCC CTT GGC-3') (SEC ID NO:43)

Cebador Fw específico de la cadena ligera de New102

30 (5'-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCC TCG CTC AG-3') (SEC ID NO:44)

Cebador Rv específico de la cadena ligera de New102

35 (5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATCTCCAGCTTGG TCC CCT G-3') (SEC ID NO:45)

Cebador Fw específico de la cadena ligera de Old6

(5'-AGAGAGAGAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGC-3') (SEC ID NO:46)

40 Cebador Rv específico de la cadena ligera de Old6

(5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTGATATCCACTTTGGTCCCAGGGC-3') (SEC ID NO:47)

45 La cadena ligera del anticuerpo 7G3 de ratón se amplificó usando UPM (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y el cebador mK-Rv1 (5'-TT GAA GCT CTT GAC AAT GGG TGAAGT TGAT-3') (SEC ID NO:48) y repitiendo 30 veces un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos. Además, usando como molde 1 µl de esta disolución de reacción y usando NUP (kit de amplificación de ADNc SMART RACE; fabricado por Clontech) y mK-Rv2 (5'-GTAGGTGCTGTCTTTGCTGTCTGATCAGT-3') (SEC ID NO:49), un ciclo de reacciones a 98°C 1 segundo y 68°C 30 segundos se repitió 20 veces. Después, los productos de la PCR amplificados se purificaron usando el kit de purificación mediante PCR (QIAGEN), y la secuencia nucleotídica se determinó usando el cebador mK-Rv2. Los siguientes cebadores específicos se sintetizaron en base a la información de secuencia, y las secuencias también se determinaron desde la dirección opuesta.

55 Cebador Fw específico de la cadena ligera de 7G3

(5'-AGAGAGAGAGAGATCTCACCATGGAATCACAGACTCAGGTCCTC-3') (SEC ID NO:50)

Cebador Rv específico de la cadena ligera de 7G3

60 (5'-AGAGAGAGAGCGTACGTTTTATTTCAGCTTGGTCCCCC-3') (SEC ID NO:51)

65 La PCR se llevó a cabo usando los cebadores específicos mencionados anteriormente (98°C 1 segundo, 60°C 30 segundos, 72°C 30 segundos), y el fragmento de ADNc de la amplificación de la cadena ligera se digirió con *Bgl*II y *Bs*MI y se insertó en un vector N5KG1-Val Lark que se había escindido con las mismas enzimas. Determinando la secuencia usando el vector como molde, se encontró que la secuencia insertada es idéntica a la determinada

mediante la secuencia directa.

A continuación se muestran cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Old4, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y de la región variable de cadena ligera.

< Región variable de cadena pesada de Old4 >

GACCCGTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTCTTTGTGGTGGCAG  
 CAGCTACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGCTACAGTCTGGGGCTGAGGT  
 GAAGAAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCATGCAAGGCTTCTGGAGGCAC  
 CTTCAGCACCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTT  
 GAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTATAGTAAACTACGCACAGAA  
 GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGTACAGCCTAC  
 ATGGAAGTGAAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTGCGA  
 GAGGGGGGGGCTCGGGCCCAGATGTTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAAT  
 GGTCACCGTCTCTTCAGCTAGCACCAA (SEQ ID NO:52)

< Región variable de cadena pesada de Old4 >

MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLLQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSTYAI  
 SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGIVNYAQKFKGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE  
 DTAVYYCARGGGSPDVLDIWGQGTMTVTVSSASTX (SEQ ID NO:53)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:52, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 432 y guanina (G) en la posición 433 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 139 desde el N-terminal de SEC ID NO:53, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 140. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:53. El N-terminal de la forma madura se consideró que es glutamina (Q) en la posición 20 de SEC ID NO:53.

< Región variable de cadena ligera de Old4 >

CACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCC  
 TGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGTCATCTGGATGACCCAGTCTCCA  
 TCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGTCCGATGA  
 GTCAGGGCATTAGGAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGC  
 CCCTGAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA  
 GGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT  
 GCAGTCTGAAGATTTTGAACCTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTTTCCCGTA  
 CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTCACGGTGG (SEQ ID  
 NO:54)

< Región variable de cadena ligera de Old4 >

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWMQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGIRSY  
 LAWYQQKPGKAPELLIYAASLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQSEDFATYYC  
 QQYYSPYTFGQGTKLEIKRTVX (SEQ ID NO:55)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:54, y una frontera entre la región variable y la región

5 constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 402 y citosina (C) en la posición 403 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:55, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:55. El N-terminal de la forma madura se consideró que es valina (V) en la posición 23 de SEC ID NO:55.

10 A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Old5, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

<Región variable de cadena pesada de Old5>

GTCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTGTGGTGGCAGCAGCT  
 ACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAG  
 AAGCCTGGGTCTCGGTGAAGGTCTCATGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCA  
 GCACCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG  
 GATGGGAGGGCTCATCCCTATCTTTGATATAGAAAACACTACGCACAGAAGTTCC  
 AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGTCTATATGGA  
 ACTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCGAGAGGG  
 GGGGGTTTCGGGCCCTGATGTTCTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCA  
 CCGTCTCTTCAGCTAGC (SEQ ID NO:56)

<Región variable de cadena pesada de Old5>

MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSTYAI  
 SWVRQAPGQGLEWMGGLPIFDIENYAQKFKGRVTITADESTSTVYME LSSLRSE  
 DTAMY YCARGGSGPDVLDI WGQGMVTVSSAS (SEQ ID NO:57)

20 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:56, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 427 y guanina (G) en la posición 428 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 139 desde el N-terminal de SEC ID NO:57, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 140. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:57. El N-terminal de la forma madura se consideró que es glutamina (Q) en la posición 20 de SEC ID NO:57.

30 <Región variable de cadena ligera de Old5>

CACAGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTCC  
 TGCTGCTCTGGCTCCCAGGTGCCAGATGTGTCATCTGGATGACCCAGTCTCCA  
 TCCTTACTCTCTGCATCTACAGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGTCCGATGA  
 GTCAGGGCATTAGGAGTTATTTAGCCTGGTATCAGCAAAAACCAGGGAAAGC  
 CCCTGAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAA  
 GGTT CAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCT  
 GCAGTCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTATTATAGTTTCCCGTA  
 CACTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTCACGGTGG (SEQ ID  
 NO:58)

<Región variable de cadena ligera de Old5>

MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCVIWMQTQSPSLLSASTGDRVTISCRMSQGIRSY  
LAWYQQKPGKAPPELLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYC  
QQYYSPYTFGQGTKLEIKRTVX (SEQ ID NO:59)

5 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:58, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 402 y citosina (C) en la posición 403 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:59, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:59. El N-terminal de la forma madura se consideró que es valina (V) en la posición 23 de SEC ID NO:59.

10 A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Old17, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

<Región variable de cadena pesada de Old17>

20 GACCCGTCGACCACCAATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTGTGGTGGCAG  
CAGCTACAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGG  
TGAAGAAGCCTGGGTCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGACTTCTGGAGGCA  
CCTTCAGCAACTTTGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCT  
TGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTTCAACAAACTACGCACAG  
AAGTTCCAGGGCAGAGTCACGATTAACGCGGACGAATCCACGAGCACAGCC  
TACATGGAGCTGAGCAGTCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTG  
CGGGTGGAGACAAATATGGTCCTTACTACTTTCACTACTGGGGCCAGGGAAC  
CCTTGTCACCGTCTCCTCAGCTAGC (SEQ ID NO:60)

<Región variable de cadena pesada de Old17>

25 MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKTSGGTFSNFAI  
SWVRQAPGQGLEWMGGIPIFGSTNYAQKFQGRVTINADESTSTAYMELSSLRSE  
DTAVYYCAGGDKYGPYYFHYWGQGLVTVSSAS (SEQ ID NO:61)

30 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:60, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 432 y guanina (G) en la posición 433 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 139 desde el N-terminal de SEC ID NO:61, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 140. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:61. El N-terminal de la forma madura se consideró que es glutamina (Q) en la posición 20 de SEC ID NO:61.

<Región variable de cadena ligera de Old17>

AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC  
 TGCTCTGTTTCCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC  
 TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTTCGGGCGAGTC  
 AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC  
 TAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  
 TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCCTCCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACA  
 CTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTCACGGT (SEQ ID NO:62)

5 <Región variable de cadena ligera de Old17>

MDMRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSW  
 LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  
 QQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTX (SEQ ID NO:63)

10 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 19 desde el terminal 5' de SEC ID NO:62, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 399 y citosina (C) en la posición 400 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:63, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:63. Se considera que el N-terminal de la forma madura es ácido aspártico (D) en la posición 23 de SEC ID NO:63.

15 A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Old19, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

<Región variable de cadena pesada de Old19>

TCGACCCCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCCTCTTTGTGGTGGCAGCAGCTAC  
 AGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAA  
 GCCTGGGTCCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGC  
 AGCTATGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGG  
 TGGGAGGGATCATCCCTATCTTTGGTACAGCAAACACTACGCACAGAAGTTCCA  
 GGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGA  
 GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGG  
 ACACAAATATGGCCCCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTC  
 ACCGTCTCCTCAGCTAGCACCAAG (SEQ ID NO:64)

25 <Región variable de cadena pesada de Old19>

MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAI  
 SWVRQAPGQGLEWVGGIPIFGTANYAQKFKQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSE  
 DTAVYYCARGHKYGPYYFDYWGQGLTVSSASTK (SEQ ID NO:65)

30 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 9 desde el terminal 5' de SEC ID NO:64, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 425 y guanina (G) en la posición 426 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 139 desde el N-terminal de SEC ID NO:65, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 140. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se

estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:65. Se considera que el N-terminal de la forma madura es la glutamina (Q) en la posición 20 de SEC ID NO:65.

5 <Región variable de cadena ligera de Old19>

AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC  
 TGCTCTGTTTTCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC  
 TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTC  
 AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC  
 TAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  
 TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCCTCGGA  
 CGTTTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGTACGGTGGCT (SEQ ID  
 NO:66)

10 <Región variable de cadena ligera de Old19>

MDMRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSW  
 LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  
 QQYNSYPRTFGQGTKVEIKRTVA (SEQ ID NO:67)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 13 desde el terminal 5' de SEC ID NO:66, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 399 y citosina (C) en la posición 400 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:67, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:67. Se considera que el N-terminal de la forma madura es ácido aspártico (D) en la posición 23 de SEC ID NO:67.

A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de New102, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

25 <Región variable de cadena pesada de New102>

TCGACCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCTCTTTGTGGTGGCAGCAGCTA  
 CAGGTGTCCAGTCCCAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGA  
 30 AGCCTGGATCCTCGGTGAAGGTCTCCTGCATGGCTTCAGGAGGCACCGTCAG  
 CAGCTACGCTATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTG  
 GATGGGAGAGATCATCCCTATCTTTGGTATAGTAACTACGCACAGAAGTTCC  
 AGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAACACAGCCTACATGG  
 AGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCGAGAGA  
 GACAGCAGTGGCTGGTATTCTTGGTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACC  
 GTCTCCTCAGGCTAGCACCAAG (SEQ ID NO:68)

35 <Región variable de cadena pesada de New102>

MDWTWRFLFVVAATGVQSQVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCMASGGTVSSYA  
 ISWVRQAPGQGLEWMGEIPIFIVNYAQKFQGRVTITADESTNTAYMELSSLRS  
 EDTAIYYCARETAVAGILGYWGQGLTVSSASTK (SEQ ID NO:69)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 9 desde el terminal 5' de SEC ID NO:68, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 423 y guanina (G) en la posición 424 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 138 desde el N-terminal de SEC ID NO:69, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 139. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:69. Se considera que el N-terminal de la forma madura es glutamina (Q) en la posición 20 de SEC ID NO:69.

<Región variable de cadena ligera de New102>

AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTGGGGCTCCTGC  
 TGCTCTGTTTCCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCC  
 TCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGTCTGGGCGAGTC  
 AGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGAAAGCCCC  
 TAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  
 TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTACCCGTACA  
 CTTTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGTACGGTGGCTGCA (SEQ  
 ID NO:70)

<Región variable de cadena ligera de New102>

MDMRVLAQLLGLLLCFPGARCDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSW  
 LAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  
 QQYNSYPYTFGQGTKLEIKRTVAA (SEQ ID NO:71)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 13 desde el terminal 5' de SEC ID NO:70, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 399 y citosina (C) en la posición 400 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:71, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:71. El N-terminal de la forma madura se consideró que es ácido aspártico (D) en la posición 23 de SEC ID NO:71.

A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de Old6, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

<Región variable de cadena pesada de Old6>

CGACCCACCATGGAACTGGGGCTCCGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGA  
 AGGTGTCCAGTGTGAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCCTGGTCAA  
 GCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGT  
 AGCCATAACATGAAC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG  
 GTCTCATCCATTAGTAGTAGTAGTACATATATTATGCAGACTCAGTGAAG  
 GGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAA  
 TGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG  
 ACTGGGGCTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC  
AGCTAGC (SEQ ID NO:72)

<Región variable de cadena pesada de Old6>

MELGLRWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSHNMN  
 WVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAE  
 DTAVYYCAREDWGYFDYWGQGLTVTVSSASTK (SEQ ID NO:73)

5 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 10 desde el terminal 5' de SEC ID NO:72, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 417 y guanina (G) en la posición 418 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de serina (S) en la posición 136 desde el N-terminal de SEC ID NO:73, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 137. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta cisteína (C) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:73. El N-terminal de la forma madura se consideró que es ácido glutámico (E) en la posición 20 de SEC ID NO:73.

15 <Región variable de cadena ligera de Old6>

AGATCTCTCACCATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGGCTTCTGC  
 TGCTCTGGCTCCAGGTGCCAGATGTGCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCC  
 TCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTC  
 AGGGCATTAGCAGTGATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCTCC  
 TAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT  
 TCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCA  
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTAATAGTTACCCATTAC  
 TTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGTCACGGT (SEQ ID NO:74)

<Región variable de cadena ligera de Old6>

20 MDMRVPAQLLGLLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSDL  
 AWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC  
 QFNSYPFTFGPGTKVDIKRTVAA (SEQ ID NO:75)

25 El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 13 desde el terminal 5' de SEC ID NO:74, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 399 y citosina (C) en la posición 400 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 129 desde el N-terminal de SEC ID NO:75, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 130. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta cisteína (C) en la posición 23 desde el N-terminal de SEC ID NO:75. El N-terminal de la forma madura se consideró que es alanina (A) en la posición 24 de SEC ID NO:75.

35 A continuación se muestra cada una de las moléculas de ADN que codifican la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera de 7G3, y las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera.

<Región variable de cadena pesada de 7G3>

GTCGACCACCATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTTTCTCGTGTCAGGAACT  
 GGAGGTGTCTCTCTGAGGTCCAGCTGCAACAGTCTGGACCTGAGCTGGTG  
 AAGCCTGGGGCTTCAGTAAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACCTTCA

40

CTGACTACTACATGAAGTGGGTGAAACAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGT  
GGATTGGAGATATTATTCTAGCAATGGTGCCACTTTCTACAACCAGAAGTTC  
AAGGGCAAGGCCACTTTGACTGTGGACAGATCCTCCAGCACAGCCTACATGC  
ACCTCAACAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTACAAGATCG  
CATTACTGCGGGCCTCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCA  
CTGTCTCTGCAGCTAGC (SEQ ID NO:76)

<Región variable de cadena pesada de 7G3>

MGWSWIFLFLVSGTGGVLSEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFDYY  
MKWVKQSHGKSLEWIGDIIPSNGATFYNQKFKGKATLTVDRSSSTAYMHLNSLT  
5 SEDSAVYYCTRSHLLRASWFAYWGQGLVTVSAAS (SEQ ID NO:77)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena pesada es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 16 desde el terminal 5' de SEC ID NO:76, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 427 y guanina (G) en la posición 428 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, la región variable de cadena pesada llega hasta el resto de alanina (A) en la posición 139 desde el N-terminal de SEC ID NO:77, y la región constante está en y después de alanina (A) en la posición 140. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena pesada llega hasta serina (S) en la posición 19 desde el N-terminal de SEC ID NO:77. El N-terminal de la forma madura se consideró que es ácido glutámico (E) en la posición 20 de SEC ID NO:77.

<Región variable de cadena ligera de 7G3>

AGATCTCACCATGGAATCACAGACTCAGGTCCTCATGTCCTGCTGTTCTGGG  
TATCTGGTACCTGTGGGGACTTTGTGATGACACAGTCTCCATCCTCCCTGACT  
GTGACAGCAGGAGAGAAGGTCACTATGAGCTGCAAGTCTAGTCAGAGTCTG  
TTAAACAGTGGAAATCAAAGAAGTACTTACCTGGTATCTGCAGAAACCAG  
GGCAGCCTCCTAAATTGTTGATCTATTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTC  
CCTGATCGCTTACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCA  
GCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGT  
TATCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGT (SEQ ID  
NO:78)

<Región variable de cadena ligera de 7G3>

MESQTQVLMSLLFWVSGTCGDFVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNSG  
NQKNYLWYLQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTISSVQAE  
DLAVYYCQNDYSYPYTFGGGKLEIKR (SEQ ID NO:79)

El sitio de iniciación de la traducción del ADN de cadena ligera es un codón de ATG que comienza desde adenina (A) en la posición 11 desde el terminal 5' de SEC ID NO:78, y una frontera entre la región variable y la región constante del anticuerpo está situada entre adenina (A) en la posición 409 y citosina (C) en la posición 410 desde el terminal 5'. En la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, la región variable de cadena ligera llega hasta el resto de lisina (K) en la posición 133 desde el N-terminal de SEC ID NO:79, y la región constante está en y después de arginina (R) en la posición 134. Mediante un software de estimación de la secuencia génica (Signal P ver. 2), se estimó que la secuencia señal de la cadena ligera llega hasta la glicina (G) en la posición 22 desde el N-terminal de SEC ID NO:79. El N-terminal de la forma madura se consideró que es ácido aspártico (D) en la posición 22 de SEC ID NO:79.

35 (Preparación de anticuerpos de tipo recombinante)

Las células que expresan un anticuerpo recombinante se prepararon introduciendo en una célula hospedante cada uno de los seis vectores de expresión de los anticuerpos recombinantes construidos. Como célula hospedante para la expresión, se usó HEK293F (Invitrogen).

5 Cada vector de expresión se introdujo en HEK293F usando 293Fectin (Invitrogen). La HEK293F se cultivó en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C usando un agitador, y el sobrenadante de cultivo se recuperó alrededor de 5 días después del cultivo. El sobrenadante de cultivo recuperado se sometió a purificación por afinidad usando rmp  
 10 Protein A (Amersham-Pharmacia Biotech). PBS como un tampón de adsorción y 0,02 M de tampón de glicina (pH 3) como un tampón de elución, usando una columna de 0,8 x 40 cm (Bio-Rad Laboratories), y similar, dependiendo de la cantidad para la purificación. La fracción de elución se ajustó a alrededor de pH 7,2 añadiendo 1 M de Tris (pH 9,0). La disolución de anticuerpo así preparada se sustituyó por PBS usando una membrana de diálisis (corte 10.000, Spectrum Laboratories), y se sometió a esterilización mediante filtración usando un filtro de membrana  
 15 MILLEX-GV que tiene un tamaño de poros de 0,22 µm (Millipore), obteniendo de ese modo un anticuerpo monoclonal humano anti-IL-3Rα purificado. La concentración del anticuerpo purificado se calculó midiendo la absorbancia a 280 nm y considerando 1 mg/ml como 1,4 OD.

15 En la Tabla 1 se muestra un resumen de las secuencias de aminoácidos y SEC ID nº de cada CDR (región determinante de la complementariedad) del anticuerpo humano.

[Tabla 1]

Región variable de cadena pesada	SEC ID NO CDR 1 CDR 2 CDR 3	CDR 1	CDR 2	CDR 3
Old4	113 114 115	TYAIS	GIPIFGIVNYAQKFQG	GGGSGPDVLDI
Old5	116 117 118	TYAIS	GLIPIFDIENYAQKFQG	GGGSGPDVLDI
Old17	119 120 121	NFAIS	GIPIFGSTNYAQKFQG	GDKYGPYYFHY
Old19	122 123 124	SYAIS	GIPIFGTANYAQKFQG	GHKYGPYYFDY
New102	125 126 127	SYAIS	EIPIFGIVNYAQKFQG	ETAVAGILGY
Old6	128 129 130	SHNMN	SISSSSSYIYYADSVKG	EDWGYFD
Old4	131,132,133	RMSQGIRSYLA	AASTLQS	QQYYSFPYT
Old5	134, 135, 136	RMSQGIRSYLA	AASTLQS	QQYYSFPYT
Old17	137,138,139	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNSYPYT
Old19	140,141,142	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNSYPRT
New102	143,144,145	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYNSYPYT
Old6	146,147,148	RASQGISSDLA	DASSLES	QQFNSYPFT

20 **Ejemplo 5 Purificación de anticuerpo humano anti-IL-3Rα a partir de sobrenadante de cultivo de hibridoma**

Se cultivó un hibridoma después de adaptarlo desde el medio DMEM que contiene IL-6 usado en el ejemplo 3 al medio E-RDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.). Se purificó un anticuerpo a partir del sobrenadante de cultivo. La purificación del anticuerpo se llevó a cabo según el ejemplo 4.

25 Primeramente, un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal humano anti-IL-3Rα se adaptó a medio eRDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.) que contiene 10 ng/ml de IL-6 y 10% de suero fetal de ternera (FCS: SIGMA). A continuación, el hibridoma obtenido se adaptó a medio eRDF (Kyokuto Pharmaceutical Industrial Co., Ltd.) que contiene insulina bovina (5 µg/ml, GIBCO BRL), transferrina humana (5 µg/ml, GIBCO BRL), etanolamina (0,01 mM, SIGMA), selenito de sodio (2,5 x 10<sup>-5</sup> mM, SIGMA) y 1% FCS bajo en IgG (HyClone). Este hibridoma adaptado se cultivó en un matraz, y se recuperó el sobrenadante de cultivo. El sobrenadante recuperado se sometió a filtros de 10 µm y 0,2 µm (Gelman Sciences Inc.) para eliminar artículos inútiles tales como un hibridoma y similar. El anticuerpo se purificó a partir del sobrenadante así recuperado mediante el mismo método como en el ejemplo 4.

35 **Ejemplo 6 Cálculo de constantes de asociación y de disociación usando el anticuerpo humano anti-IL-3Rα purificado**

Las constantes de asociación y de disociación del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  purificado se analizaron usando un analizador que se basa en el principio de resonancia de plasmones de superficie (Biacore, GE Healthcare, en lo sucesivo GE). De forma breve, se inmovilizó un anticuerpo anti-humano o anticuerpo anti-ratón sobre una punta de sensor CM5, después se le aplicó un anticuerpo humano o de ratón anti-IL-3R $\alpha$  para permitir la unión, después se le aplicó la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  preparada en el ejemplo 2, y se observó la asociación y disociación usando Biacore 2000. A lo largo de todas las etapas del ensayo, se empleó básicamente el método de ensayo de GE Healthcare para el cálculo de las constantes de asociación y de disociación.

Específicamente, se usó CM5 (grado de investigación) para una punta de sensor (cada GE). En primer lugar, la punta CM5 se activó aplicando una mezcla equivalente de 400 mM de EDC (N-hidrocloruro de etil-N'-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) y 100 mM de NHS (N-hidroxisuccinimida) a la punta de CM5. A continuación, un anticuerpo contra el anticuerpo humano unido al kit de captura de anticuerpo humano (GE) (en adelante denominado anticuerpo anti-anticuerpo humano) se diluyó con la disolución adjunta al kit y se aplicó a aquella, inmovilizando de ese modo la cantidad requerida del anticuerpo anti-anticuerpo humano a la punta de CM5. Con respecto al anticuerpo de ratón a usar como control, un anticuerpo contra el anticuerpo de ratón unido al kit de captura de anticuerpo de ratón (GE) (en adelante denominado anticuerpo anti-anticuerpo de ratón) se diluyó con la disolución adjunta al kit y se aplicó a aquella, inmovilizando de ese modo una cantidad necesaria del mismo a la punta de CM5. A continuación, la superficie de la punta activada se bloqueó y se inactivó aplicándole 1 M de dihidrocloruro de etanolamina. Mediante las etapas anteriores hasta esta, se completó la preparación de una punta de sensor CM5 que puede medir la constante de disociación  $K_D$ .

A continuación, cada uno de los anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  se diluyó para proporcionar una concentración de 5  $\mu$ g/ml con tampón de HBS-FP (GE), una clase por celda de flujo, y se aplicó, permitiendo de ese modo que se unieran al anticuerpo anti-anticuerpo humano o al anticuerpo anti-anticuerpo de ratón inmovilizados. A continuación, se le aplicó la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$ . A fin de disociar el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  unido y la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$ , se aplicó, en la cantidad adjunta al kit 3M de MgCl<sub>2</sub> adjunto al kit de captura de anticuerpo humano, o glicina-HCl de pH 1,7 adjunta al kit de captura de anticuerpo de ratón. Las etapas hasta ésta se consideraron como una etapa. Repitiendo las mismas etapas usando dos o más concentraciones de la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$ , se obtuvieron datos para calcular las constantes de asociación y de disociación (sensograma).

La concentración de la forma soluble de proteína IL-3R $\alpha$  humana aplicada a un sujeto se calculó como se describe en el ejemplo 2 midiendo la absorbancia a 280 nm y considerando 1 mg/ml como 1,4 OD. El peso molecular de la forma soluble de proteína IL-3R $\alpha$  se calculó según lo siguiente. Con respecto al peso molecular de la proteína IL-3R $\alpha$ , se ha dado a conocer que comprende 360 restos de aminoácidos, tiene seis sitios de unión a la cadena de azúcar de tipo N, y el peso molecular es 70 kDa (The Cytokine Facts Book segunda edición, Academic Press). En consecuencia, el peso molecular de la forma soluble de la proteína IL-3R $\alpha$  humana se calculó como alrededor de 63 kDa restando los pesos moleculares de los aminoácidos de la región transmembránica y de la región intracelular de 70 kDa conocido como información de referencia, y añadiendo, al valor resultante, el peso molecular de los aminoácidos de la secuencia FLAG.

En el análisis, se usó el software Biaevaluation (GE), y se hizo referencia al Biaevaluation Software Handbook. Específicamente, llevando a cabo el análisis simultáneo del análisis cinético, empleando básicamente el modelo de reacción de unión de Langmuir 1:1 y ajustando, se calcularon la constante de velocidad de asociación ( $K_a$ ) y la constante de velocidad de disociación ( $K_d$ ), y el valor de la constante de disociación  $K_D$  se calculó mediante el cálculo de  $K_d/K_a$ .

Los resultados se muestran en la siguiente tabla 2.

[Tabla 2]

Nombre del anticuerpo	$K_a$	$K_d$	$K_D$
Anticuerpos humanos			
Old4	$3,88 \times 10^5$	$5,15 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-9}$
Old5	$7,17 \times 10^5$	$4,72 \times 10^{-4}$	$6,58 \times 10^{-10}$
Old17	$2,08 \times 10^5$	$2,98 \times 10^{-4}$	$1,43 \times 10^{-9}$
Old19	$1,54 \times 10^5$	$4,99 \times 10^{-4}$	$3,24 \times 10^{-9}$
New102	$6,02 \times 10^5$	$4,80 \times 10^{-4}$	$7,98 \times 10^{-10}$
Old6	$1,71 \times 10^6$	$2,15 \times 10^{-5}$	$1,26 \times 10^{-9}$
Anticuerpo quimérico			
7G3	$2,48 \times 10^5$	$4,66 \times 10^{-4}$	$1,88 \times 10^{-9}$
Anticuerpos de ratón			
7G3	$1,68 \times 10^5$	$9,52 \times 10^{-5}$	$5,66 \times 10^{-10}$
9F5	$7,13 \times 10^4$	$6,5 \times 10^{-5}$	$9,11 \times 10^{-10}$
107D2.08	$4,16 \times 10^5$	$2,03 \times 10^{-5}$	$4,88 \times 10^{-8}$
AC145	$7,66 \times 10^4$	$4,26 \times 10^{-5}$	$5,57 \times 10^{-8}$

L-16	8,13×10 <sup>5</sup>	4,16×10 <sup>-5</sup>	5,12×10 <sup>-9</sup>
------	----------------------	-----------------------	-----------------------

**Ejemplo 7 Análisis del epítipo de anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  humana**

(Preparación de célula de expresión de proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$ )

5 A fin de llevar a cabo el análisis del epítipo del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ , se expresó en una célula una proteína quimérica en la que una porción de la región extramembránica de IL-3R $\alpha$  se substituyó por GM-CSFR $\alpha$ , y se analizó la actividad de unión de cada anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  frente a la célula. De forma breve, en primer lugar, la molécula de IL-3R $\alpha$  y la molécula de GM-CSFR $\alpha$  se dividieron en tres regiones (dominios A, B y C desde el N-terminal mencionado anteriormente); en segundo lugar, se construyeron respectivamente vectores que expresan moléculas en las que cada uno de los dominios A, B y C de la molécula de IL-3R $\alpha$  se substituyó por el dominio correspondiente de la molécula de GM-CSFR $\alpha$ ; en tercer lugar, aquellos se expresaron de forma forzada en célula HEK293F; y en cuarto lugar, se observó mediante citometría de flujo si cada anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  marcado con un colorante fluorescente se une a ellos o no.

(Preparación de ADN plasmídico de GM-CSFR/pEF6/Myc-HisC)

20 Se amplificó un ADNc de la cadena  $\alpha$  del receptor GM-CSFR humano (GM-CSFR $\alpha$ , CD116) a partir de un ADNc derivado de bazo (CLONTECH Human MTC Panel), mediante un método de PCR usando KOD-Plus-Ver. 2 (Toyobo Co., Ltd.). Como dispositivo de PCR, se usó GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 2 minutos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 98°C 10 segundos-55°C 30 segundos-68°C 75 segundos, 35 ciclos. Los cebadores de la PCR usados fueron los siguientes.

25 hCD116Fw-MfeI:

5'-CGGCAATTGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCT-3' (SEC ID NO:80)

30 hCD116Rv-NotI:

5'-ATTGCGGCCGCTCAGGTAATTCCTTCACGG-3' (SEC ID NO:81)

35 Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se cortó una banda de aproximadamente 1,2 kb, y el ADN se extrajo usando JETsorb Kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Alemania) y después se digirió con *NotI* y *MfeI*. Un AND plasmídico de pEF6/Myc-HisC (Invitrogen) se digirió con *EcoRI* y *NotI*. Cada ADN se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8%, y se cortaron bandas a alrededor de 1,2 kb y alrededor de 6 kb, y las moléculas de ADN se extrajeron usando JETsorb Kit (Genomed, Bad Oeynhausen, Alemania). Después, se mezclaron 0,5  $\mu$ l de una disolución de ADN derivada de ADN plasmídico de pEF6/Myc-HisC y 4  $\mu$ l de una disolución de ADN derivada del producto de la PCR, y se sometió a ligación usando el kit de ligación de TaKaRa (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la transformación, se mezclaron una muestra de ligación y células competentes DH5 alfa y se extendieron sobre una placa de LB. La comprobación de la inserción se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias usando LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 94°C 30 segundos-55°C 30 segundos-72°C 2 minutos, 40 ciclos, y después se llevó a cabo un tratamiento a 99°C durante 30 minutos.

Los cebadores de la PCR usados fueron los siguientes.

50 hCD116Fw-MfeI:5'-CGGCAATTGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACAAGCCT-3' (SEC ID NO:82)

hCD 116Rv-NotI:5'-ATTGCGGCCGCTCAGGTAATTCCTTCACGG-3' (SEC ID NO:83)

55 Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Usando una colonia a partir de la cual se obtuvo una amplificación de alrededor de 1,2 kb, se determinó una secuencia nucleotídica mediante un método de secuenciación directa. En la reacción de muestras de secuencia, se usaron BigDye(R) Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) y GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) (éstos se usaron en todos los análisis de secuencias de ADN en esta memoria descriptiva). Los cebadores de la PCR usados fueron los siguientes.

60 hCD116Rv-NotI: 5'-ATTGCGGCCGCTCAGGTAATTCCTTCACGG-3' (SEC ID NO:85)

hCD116SeqFw1: 5'-TGAAGTGTACCTGGGCGAGG-3' (SEC ID NO:86)

## ES 2 550 639 T3

hCD116SeqFw2: 5'-CTGGCACGGAAAACCTACTG-3' (SEC ID NO:87)

hCD116SeqRv1: 5'-CCTGAATTTGGATAAAGCAG-3' (SEC ID NO:88)

5 Como dispositivo analizador de las secuencias, se usó un analizador de ADN ABI 3700XL (Applied Biosystems) (éste se usó en todos los análisis de secuencias de ADN en esta memoria descriptiva). Seleccionando un clon en el cual no se encontró mutación en la secuencia de aminoácidos mediante PCR, se extrajo ADN plasmídico mediante el método Largeprep (QIAGEN).

### 10 (Preparación de IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1)

El ADNc de longitud completa de IL-3R $\alpha$  humana (CD123) amplificó mediante PCR, y se ligó una etiqueta FLAG en su dirección 3' (IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1).

15 El ADNc de IL-3RA se amplificó mediante un método de PCR usando como molde ADN plasmídico de hCD123/pEGFP-N1 y LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 60 segundos, 10 ciclos, y después se llevaron a cabo 2 minutos de una reacción de alargamiento. Los cebadores de la PCR usados son los siguientes.

20 T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' (SEC ID NO:89)

hCD123-C-FLAG-R1:

25 5'-TCGTCATCGTCCTTGTAGTCAGTTTTCTGCACGACCTGTA-3' (SEC ID NO:90)

Usando como molde 2  $\mu$ l del producto de la PCR, se llevó a cabo la amplificación mediante un método de PCR usando LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 60 segundos, 10 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de la PCR usados son como siguen.

30 IL-3R $\alpha$ \_Fw:

35 5'-CGGCAATTGCCACCATGGTCCTCCTTTGGCTCAC-3' (SEC ID NO:91)

C-FLAG-NotR2:

40 5'-AAAAGCGGCCGCTCACTTGTGTCATCGTCCTTGTAGTC-3' (SEC ID NO:92)

Los productos de la PCR así obtenidos se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se cortó una banda a alrededor de 1 kb, y el ADN se extrajo usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Toda la cantidad del ADN extraído se digirió con *MfeI* y *NotI* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE).

45 El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se cortó una banda a alrededor de 1 kb, y el ADN se extrajo usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. Después, se mezclaron 5  $\mu$ l del ADNc de IL-3RA-FLAG así extraído y 1  $\mu$ l del ADN plasmídico de pEGFP-N1 que se había escindido con *EcoRI* y *NotI*, y se ligaron usando el kit de ligación de TaKaRa (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la transformación, se mezclaron una mezcla de ligación y células competentes DH10B, y se extendieron en una placa de LB (que contiene kanamicina). La comprobación de la inserción se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias usando LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, después de una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 60 segundos, 35 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de la PCR usados son como siguen.

55 pEGFP-N1-Fw: 5'-CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEC ID NO:93)

pEGFP-N1-Re: 5'-TTTATGTTTCAGGTTTCAGG-3' (SEC ID NO:94)

60 Se extrajo un ADN plasmídico mediante un método Miniprep a partir de una colonia en la que se obtuvo una amplificación de alrededor de 0,8 kb.

Se descubrió mediante un análisis de secuencia de ADN que el ADN plasmídico de IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 purificado no tiene una mutación causada por la PCR, y que la etiqueta de FLAG está presente en él. Los cebadores usados en el análisis de secuencia de ADN son los siguientes.

65

pEGFP-N1-Fw: 5'-CGTGTACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEC ID NO:95)

pEGFP-N1-Re: 5'-TTTATGTTTCAGGTTTCAGG-3' (SEC ID NO:96)

5 (Cartografiado de los dominios de IL-3R $\alpha$ )

10 Como resultado de la búsqueda de BLASTP (base de datos: proteínas del Protein Data Bank (pdb)), la cadena alfa del receptor de IL-13 (IL-13R $\alpha$ ) tuvo la puntuación más alta (PDB: 3BPNC; cadena C, estructura cristalina del complejo ternario Il4-Il4r-Il13ra). Usando el archivo de PDB bajado del Protein Data Bank, y un software de gráficos RasMol, se visualizó la estructura tridimensional de la proteína IL-13R $\alpha$ , y se dividieron tres dominios que constituyen la región extracelular (los dominios A, B y C mencionados anteriormente). Usando el software de Alineamiento Múltiple MUSCLE, se comparó la secuencia de aminoácidos de IL-3R $\alpha$  y la secuencia de aminoácidos de IL-13R $\alpha$ , y la región extracelular de la región IL-3R $\alpha$  también se dividió en tres dominios. Además, GM-CSFR $\alpha$  y IL-3R $\alpha$  se compararon de la misma manera, y la región extracelular de GM-CSFR $\alpha$  también se dividió en tres dominios.

15 Para asignar epítomos de anticuerpos humanos IL-3R $\alpha$  humana, se prepararon proteínas en las que cada uno de los tres dominios de IL-3R $\alpha$  se sustituyó uno por uno por dichos dominios de GM-CSFR $\alpha$ , y se expresaron en la membrana celular, y se confirmó la presencia o ausencia de unión del antígeno.

20 Usando como molde el ADN plasmídico de IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1, la amplificación se llevó a cabo mediante un método de PCR que usa PrimeSTAR(R) HS DNA Polymerase ((TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, se llevó a cabo una reacción de dos etapas a 98°C 10 segundos-68°C 6 minutos, 25 ciclos. Los cebadores de la PCR usados son los siguientes.

25 Deficiencia del dominio A;

CD123R11pEGFPN1: AAAGGTACCGAATTCGAAGCTTGAGCTC (SEC ID NO:97)

30 CD123F11: AAAGGTACCGGAAGCCTTGGGCAGGT (SEC ID NO:98)

Deficiencia del dominio B;

CD123R12-2: AAAGGTACCACTGTTCTCAGGGAAGAGGAT (SEC ID NO:99)

35 CD123F12-2: AAAGGTACCCAGATTGAGATATTA ACTCC (SEC ID NO:100)

Deficiencia del dominio C;

40 CD123R13: AAAGGTACCTGAAAAGACGACAACTT (SEC ID NO:101)

CD123F13: AAAGGTACCTCGCTGCTGATCGCGCTG (SEC ID NO:102)

45 El producto de la PCR así obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Tras confirmar la amplificación, se purificó usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. El ADN así obtenido se digirió con *KpnI* y *DpnI*, se purificó usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System, y se ligó usando el kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, se mezclaron una muestra de ligación y células competentes DH10B, y se extendieron sobre una placa de LB (que contiene kanamicina). La comprobación del inserto se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias, usando LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 40 segundos, 38 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de la PCR usados son como siguen.

55 pEGFP-N1-Fw: 5'-CGTGTACGGTGGGAGGTCTA -3' (SEC ID NO:103)

pEGFP-N1-Re: 5'-TTTATGTTTCAGGTTTCAGG -3' (SEC ID NO:104)

60 El producto de la PCR así obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se extrajo un ADN plasmídico mediante el método Miniprep a partir de una colonia en la que se obtuvo una amplificación a alrededor de 1 kb.

65 Usando como molde el ADN plasmídico de GM-CSFR/pEF6/Myc-HisC, se llevó a cabo la amplificación mediante un método de PCR que usa PrimeSTAR(R) HS DNA Polymerase (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, se llevó a cabo una reacción de dos etapas a 98°C 10 segundos-68°C 30 segundos, 25 ciclos. Los cebadores de la PCR

usados son como se expone a continuación.

Inserción del dominio A;

5 GM-CSFRF11: AAAGGTACCGCCACCATGCTTCTCCTGGTGACA (SEC ID NO: 105)

GM-CSFR11: AAAGGTACCTGAATTTGGATAAAGCAG (SEC ID NO:106)

Inserción del dominio B;

10 GM-CSFRF12: AAAGGTACCGGAAGGGAGGGTACCGCT (SEC ID NO:107)

GM-CSFR12: AAAGGTACCCTTTGTGTCCAAAAGTGA (SEC ID NO:108)

15 Inserción del dominio C;

GM-CSFRF13: AAAGGTACCAAATAGAACGATTCAAC (SEC ID NO:109)

20 GM-CSFR13: AAAGGTACCAATGTACACAGAGCCGAG (SEC ID NO: 110)

El producto de la PCR así obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Tras confirmar la amplificación, se purificó usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System.

25 El ADN así obtenido se digirió con *KpnI* y después se purificó usando el kit de extracción en gel QIAquick (QIAGEN), se mezcló con ADN plasmídico de IL-3RA-FLAG/pEGFP-N1 en el que se suprimió el dominio correspondiente (ya escindido con *KpnI* y purificado), y se ligó usando kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, se mezclaron una muestra de ligación y células competentes DH10B y se extendieron sobre una placa de LB (que contiene kanamicina). La comprobación del inserto se llevó a cabo mediante PCR directa de colonias usando LA Taq (TAKARA BIO INC.). Con respecto a la PCR, tras una etapa de desnaturalización a 95°C durante 1 minuto, se llevó a cabo una reacción de tres etapas a 95°C 15 segundos-56°C 15 segundos-72°C 40 segundos, 38 ciclos, y después se llevó a cabo una reacción de alargamiento a 72°C durante 2 minutos. Los cebadores de la PCR usados son como siguen.

35 pEGFP-N1-Fw: 5'-CGTGACGGTGGGAGGTCTA-3' (SEC ID NO:111)

pEGFP-N1-Re: 5'-TTTATGTTTCAGGTTTCAGG -3' (SEC ID NO:112)

40 El producto de la PCR así obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Se extrajo un ADN plasmídico mediante el método Miniprep a partir de una colonia en la que se obtuvo una amplificación a alrededor de 1 kb.

(Marcaje del anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  con colorante fluorescente)

45 A fin de determinar la actividad de unión de anticuerpos humanos anti-IL-3R $\alpha$  humana, cada anticuerpo humano se marcó con un colorante fluorescente AlexaFlour488 (Molecular Probe, Invitrogen). Con respecto al método de marcaje, se llevó a cabo según el manual proporcionado por Invitrogen; y con respecto a la detección, la fluorescencia se detectó mediante FL1 de una citometría de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences).

50 Específicamente, se añadió 1/10 volúmenes de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M a una disolución de anticuerpo disuelta en PBS. A continuación, se añadió una cantidad predeterminada de la disolución de anticuerpo descrita en el manual a un recipiente que contiene polvo de AlexaFlour488 al que se había añadido tetrafluorofenilo (TFP), y se dejó reaccionar en la oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora mientras se agitaba. A continuación, después de que una columna de filtración en gel (NAP-10 y similar, GE Healthcare) se sustituyó suficientemente con PBS, se le añadió la disolución de anticuerpo que se hizo reaccionar con AlexaFlour488, mientras que el tampón de la disolución del anticuerpo se sustituyó por PBS. Se obtuvo una fracción de anticuerpo que mostró un color amarillo verdoso. Con respecto al anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana marcado con AlexaFlour488 obtenido de la manera anterior, las absorbancias a longitudes de onda de 280 nm y 494 nm (A280 y A494, respectivamente) se midieron usando un espectrómetro, y la concentración de anticuerpo se calculó mediante la siguiente fórmula de cálculo.

60 Concentración de anticuerpo (mg/ml) = (A280 - A494 x 0,11)/1,4

(Análisis mediante citometría de flujo de la célula que expresa la proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$  usando anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  marcado)

65

Para la preparación de la célula de expresión de la proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$ , se usó la célula HEK293T (ATCC CRL 1268). Usando 293Fectin (Invitrogen), el ADN plasmídico obtenido en lo anterior se introdujo como un vector de expresión en la HEK293T. La HEK293T a la que se le introdujo el vector de expresión se cultivó usando un agitador en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C después de 2 días de la introducción, y la proteína obtenida se usó para el análisis de citometría de flujo.

Se dejaron reaccionar durante 30 minutos en hielo de 100.000 a 1.000.000 células de la célula de expresión de la proteína quimérica, a una concentración de 1  $\mu$ g/ml, con un anticuerpo humano marcado con AlexaFlour488 o un anticuerpo de ratón anti-IL-3R $\alpha$  marcado con FITC comercialmente disponible (7G3 o 9F5: ambos de BD Biosciences, 6H6: Acris Antibodies, AC145: Milteny Biotech, 107D2.08: Dendritics). Para la dilución de los anticuerpos y las células, se usó un medio de tinción (PBS de Dulbecco suplementado con 2% de suero fetal bovino, 2 mM de EDTA y 0,05% de NaN<sub>3</sub>). A continuación, las células que reaccionaban con los anticuerpos se lavaron tres veces con el medio de tinción, y se confirmó mediante citometría de flujo si el anticuerpo marcado se unió o no a la célula.

Los resultados se representan en las figuras 1 y 2. Las reacciones de los anticuerpos 7G3, 9F5, 6H6 y AC145 desaparecieron solamente en las células que expresan una proteína en la que un dominio A se sustituyó por GM-CSFR $\alpha$ . Por otro lado, las reacciones de los anticuerpos Old4, Old5, Old19 y New102 desaparecieron en las células que expresan una proteína en la que el dominio B se sustituyó por GM-CSFR $\alpha$ . Con respecto a Old19, su reacción con las células que expresan una proteína en la que el dominio A se sustituyó por GM-CSFR $\alpha$  también desapareció. Con respecto a Old6 y 107D2.08, desapareció su reacción con células que expresan la proteína sustituida con el dominio B y el dominio C.

Basándose en lo expuesto anteriormente, se mostró la posibilidad de que 7G3, 9F5, 6H6 y AC145 reconocieron el dominio A, y Old4, Old5 y New102 reconocieron el dominio B, Old19 reconoció el dominio A y el dominio B, y Old6 y 107D2.08 reconocieron el dominio B y el dominio C. En consecuencia, la reactividad de los diversos anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  frente a los dominios A a C de IL-3R $\alpha$  fue como en la siguiente Tabla 3.

[Tabla 3]

	7G3	9F5	6H6	AC145	107D2.08	Old19	New102	Old4	Old5	Old6	Old28
Sin sustitución	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++
Sustitución del dominio A	-	-	-	-	++	-	++	++	++	++	+
Sustitución del dominio B	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Sustitución del dominio C	++	++	++	++	-	++	++	++	++	-	++

### Ejemplo 8 Análisis de la actividad bloqueadora de la señalización de IL-3 de los anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$

Para examinar si los anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  así obtenidos inhiben la señalización de IL-3, se usó una estirpe celular TF-1 (DMSZ n° ACC344) que crece dependientemente de IL-3 o de GM-CSF. Específicamente, la célula TF-1 se diluyó con medio RPMI 1640 que contiene 1 ng/ml de IL-3 y 10% de suero fetal de ternera (medio TF-1), y se dispensó en una placa de 96 pocillos. Además, diversos anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  y una IgG derivada de suero humano como anticuerpo de control negativo se diluyeron con el medio TF-1, se transfirieron a la placa de 96 pocillos, y se añadieron de tal manera que la concentración final de cada anticuerpo dio una concentración final de 10 o 100  $\mu$ g/ml. Como control, se preparó un pocillo de medio solo libre de células y un pocillo al que se añadió la célula TF-1. Después de 3 días de cultivo en un entorno de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, se le añadió CelltiterGlo (Promega) en una cantidad equivalente al medio. Después de 30 minutos de dejar reposar, la emisión se determinó usando un lector de placas (ARBO, Perkin Elmer).

Para la relación de inhibición del crecimiento, se llevó a cabo el siguiente cálculo.

$$(\text{emisión de muestra} - \text{pocillo sin células}) / (\text{pocillo al que se añadió célula TF-1 sola} - \text{pocillo sin células}) \times 100 (\%)$$

Con respecto a los anticuerpos comercialmente disponibles 9F5, 6H6 y 107D2.08, se usó una columna NAP-5 con el fin de sustituir el tampón por PBS. Específicamente, se añadieron 0,5 ml de una disolución de anticuerpo a la columna NAP-5 suficientemente sustituida con PBS. Después, añadiendo 1,0 ml de PBS, se recuperó la disolución descargada de la columna. Al llevar a cabo la esterilización mediante filtración usando un filtro de membrana MILLEX-GV (Millipore) que tiene un tamaño de poros de 0,22  $\mu$ m, se obtuvo un anticuerpo disuelto en PBS como

disolvente.

Los resultados se muestran en la figura 5. Se encontró que el anticuerpo Old4, el anticuerpo Old5, el anticuerpo Old17, el anticuerpo Old19, el anticuerpo New102, el anticuerpo 9F5 y el anticuerpo 6H6 no inhiben la señalización de IL-3, y por otro lado se encontró que el anticuerpo 7G3, el anticuerpo Old6 y el anticuerpo 107D2.08 inhibieron la señalización de IL-3.

**Ejemplo 9 Examen de la influencia sobre la capacidad formadora de colonias usando el anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$**

Se llevó a cabo un ensayo de colonias para encontrar si diversos anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$  tienen efectos sobre la capacidad formadora de colonias por células precursoras hematopoyéticas.

De forma breve, se añadieron 400 células/ml de células CD34 positivas derivadas de sangre de cordón (AllCells) a un medio Methocult (Stem Cell Technologie) suplementado con eritropoyetina, IL-3, G-CSF y factor de células troncales, y se midió el número de colonias 14 días a 16 después. Las colonias se contaron dividiéndolas en una colonia del sistema de granulocitos/macrófagos (CFU-GM), una colonia del sistema eritroide (BFU-E), y colonias mixtas (CFU-Mix o CFU-GEMM). Con respecto al método de clasificación de los tipos de colonias, se usó como referencia un manual proporcionado por Stem Cell Technologie o por diversos libros de texto en hematología.

Como los anticuerpos, se usó cada uno del anticuerpo quimérico 7G3 como anticuerpo en el que se descubrió actividad bloqueadora de la señalización de IL-3 en el ejemplo 8, y el anticuerpo New102 como un anticuerpo en el que no se encontró la actividad bloqueadora.

Los resultados se muestran en la figura 6. En el ensayo de colonias en el que se añadieron eritropoyetina, IL-3, G-CSF y factor de células troncales, se encontró una disminución en el número de colonias y una disminución en el tamaño de las colonias por la adición del anticuerpo 7G3 que tuvo la actividad bloqueadora de la señalización de IL-3. Por otro lado, no se encontró cambio en el número de colonias por la adición del anticuerpo New102. Basándose en este resultado, se considera que la influencia sobre la función hematopoyética normal es pequeña, y los efectos secundarios son pocos cuando la señalización de IL-3 no se inhibe o no se bloquea.

**Ejemplo 10 Efecto antitumoral en un modelo de ratón portador de tumor usando anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$**

El anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  así obtenido se administró a un modelo de ratón portador de tumor, y se examinó su efecto antitumoral. De forma breve, se transfirió una célula de leucemia a un ratón a través de su vena caudal, se le administró el anticuerpo al día siguiente, y alrededor de 3 semanas después, se contó el número de células leucémicas en células de médula ósea recogidas de un hueso de ratón.

Específicamente, se diluyeron 0,01 ml equivalentes de antisero anti-asialoGM1 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) con disolución salina fisiológica, y se administró a ratón SCID (CLEA Japan Inc.) (Día -1). Al día siguiente, se transplantaron 500.000 células de la estirpe celular de leucemia mieloide aguda, MOLM13 (ATCC), a través de la vena caudal (Día 0). Posteriormente al día siguiente (Día 1), se administraron intraperitonealmente 10  $\mu$ g del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ . El ratón se sacrificó en el Día 21, se recogió la médula ósea de fémures y tibias, y las células de médula ósea se teñieron con anticuerpo anti-CD45 humano marcado con FITC y con anti-IL-3R $\alpha$  marcado con PE (ambos de BD Biosciences). Específicamente, el anticuerpo se añadió a aproximadamente 1.000.000 células de la célula de médula ósea, para proporcionar una concentración final de 1  $\mu$ g/ml para cada uno, y se dejó reposar en hielo durante 30 minutos a la sombra. Después, las células teñidas con el anticuerpo se lavaron 3 veces usando medio de tinción (una disolución preparada añadiendo 2% de suero fetal bovino, 0,05% de azida sódica y 2 mM de EDTA a PBS (GIBCO)), y se detectó una célula positiva para CD45 humana y positiva para IL-3R $\alpha$  humana mediante una citometría de flujo (FACSCalibur, BD Biosciences). También, en el momento de recoger la médula ósea de ratón, se contó el número de células de médula ósea usando disolución de TURK. Además, el número absoluto de las células MOLM13 contenidas en un fémur se contó añadiendo simultáneamente perlas fluorescentes cuantificadas (Flow-Count, Beckman Coulter) en el momento de la tinción con anticuerpo mencionado anteriormente.

Los resultados se muestran en la figura 7. Se descubrió que el número de células MOLM13 en la médula ósea de fémur en cada grupo al que se le administró anticuerpo está notablemente reducido en comparación con el grupo de vehículo al que no se le administró el anticuerpo. Este resultado muestra que el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  tiene posibilidades como agente terapéutico para la leucemia.

**Ejemplo 11 Ensayo de toxicidad de la célula que expresa IL-3R $\alpha$  mediante anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$**

Para medir la citotoxicidad mediada por el anticuerpo (citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo, en lo sucesivo denominada ADCC), ésta se llevó a cabo en presencia de anticuerpo usando células mononucleares de sangre periférica humana (células mononucleares de sangre periférica, en lo sucesivo PBMC) como un efector.

La sangre periférica se recogió de un voluntario sano, y se añadió un anticoagulante. La sangre se colocó estáticamente en Ficoll-Plaque Plus (GE Healthcare) de manera que no se perturbó la interfaz, y se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 minutos usando una centrífuga grande (CF9RX, Hitachi, Ltd.). La capa intermedia que contiene las células se recogió y se lavó con PBS, se eliminaron las plaquetas mediante centrifugación a 900 rpm durante 20 minutos, y las células mononucleares derivadas de sangre periférica (PBMC) se usaron como un efector.

Además, también se usó como un efector del ensayo de ADCC PBMC cultivadas toda la noche en condiciones de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> usando medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero fetal bovino al que se añadió IL-2 humana (Peprotech) hasta una concentración final de 4 ng/ml (40 UI/ml o más).

En el método, de forma simple, una célula diana se cultiva en presencia de un anticuerpo y PBMC, y se mide el porcentaje de lisis de la célula diana específica mediante el anticuerpo.

Para la medida del porcentaje de lisis, se usó el siguiente "método de ensayo de ADCC de Colon-26/hCD123". Específicamente, una célula diana se marcó con <sup>51</sup>Cr cultivando como célula diana la célula Colon-26 que expresa forzosamente IL-3R $\alpha$ , a 37°C durante 1 hora en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>, junto con cromato de sodio marcado con un radioisótopo <sup>51</sup>Cr (Na<sub>2</sub><sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, Perkin Elmer, NEZ030S). La célula diana marcada se lavó 3 veces para eliminar <sup>51</sup>Cr en exceso, y después se suspendió en el medio y se transfirió a una placa de 96 pocillos a la que se habían añadido previamente anticuerpos a diversas concentraciones. Se suspendió PBMC en el medio y se transfirió a la placa a la que se habían añadido la célula diana y los anticuerpos (relación efector/diana = 100). Como los anticuerpos, se usó el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  purificado en el ejemplo 4, y como control negativo, IgG derivada de suero humano (SIGMA). Como diversos controles, se preparó un pocillo del medio y célula diana solos, un pocillo de PBMC y célula diana solas, y un pocillo suplementado con Triton-X. La placa de 96 pocillos llena de disoluciones mixtas se cultivó a 37°C durante 4 horas en presencia de 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras centrifugar la placa, se transfirieron 50  $\mu$ l de cada sobrenadante a una placa de 96 pocillos que contiene líquido de centelleo (Lumaplate-TM, Perkin Elmer), y se secó a 56°C durante 2 horas. La placa se cerró herméticamente (TopSeal-A, Packard) y se midió usando un lector de microplacas (TopCount, Perkin Elmer).

Con respecto al porcentaje de lisis de la célula diana, se midió la cantidad de <sup>51</sup>Cr en el cromato de sodio liberada al medio debido a la lisis de las células. Esto es, el "porcentaje de lisis específica" se calculó dividiendo un valor obtenido restando el valor de un pocillo al que no se había añadido el anticuerpo del valor de cada pocillo, entre un valor obtenido restando el valor de un pocillo al que no se había añadido el anticuerpo del valor de un pocillo al que se añadió Triton-X (el porcentaje de lisis específica se ajusta a 100%).

Los resultados se muestran en las figura 8 y figura 9. En cada uno de los anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ , se encontró que la actividad de ADCC para la célula diana depende de la concentración. También, estos anticuerpos mostraron una mayor actividad de ADCC que el anticuerpo quimérico 7G3 como control. Esto muestra que el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  presenta actividad de ADCC elevada para células que expresan IL-3R $\alpha$ , y tiene una posibilidad de un tratamiento en el que la eficacia farmacéutica es la eliminación de las células positivas a IL-3R $\alpha$ .

#### **Ejemplo 12 Ensayo de afinidad de anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ frente a proteína IL-3R $\alpha$ de mono**

Con respecto a la presencia o ausencia de unión del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana así obtenido frente a IL-3R $\alpha$  de mono, se analizó, usando citometría de flujo, si el anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana preparado en el ejemplo 7 se une o no a la célula que expresa forzosamente IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis* preparada en el ejemplo 1.

Específicamente, 2 x 10<sup>5</sup> células de la célula L929 que expresa de forma forzada IL-3R $\alpha$  de mono se dejaron reaccionar con 100  $\mu$ l de manera que una concentración final de 10  $\mu$ g/ml, del anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana a 4°C durante 30 minutos. Los anticuerpos usados son anticuerpo IgG1 humano anti-dinitrofenol (DNP) (fabricado por esta firma) como control negativo, y los anticuerpos Old4, Old5, Old17, Old19, New102 y el anticuerpo quimérico 7G3. Después, se lavó 3 veces usando un medio de tinción (PBS de Dulbecco suplementado con 2% de suero fetal bovino, 2 mM de EDTA y 0,05% de NaN<sub>3</sub>). A continuación, se dejó que un anticuerpo específico de la cadena  $\lambda$  anti-anticuerpo humano marcado con PE (Southern Bio) reaccionara en el medio de tinción a una concentración final de 1  $\mu$ g/ml, y se lavó 3 veces con el medio de tinción de la misma manera. Finalmente, las células se mezclaron con el medio de tinción, y se analizó mediante citometría de flujo la presencia o ausencia de PE positivo.

Los resultados se muestran en la figura 10. Se encontró que los anticuerpos humanos anti-IL-3R $\alpha$  humana, Old4, Old5, Old17, Old19, New102 y anticuerpos quiméricos 7G3, reaccionan con la IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis*.

#### **Ejemplo 13 Análisis detallado del epítipo de anticuerpos humanos anti-IL-3R $\alpha$ humana**

(Preparación de célula que expresa la proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$ )

A fin de llevar a cabo un análisis detallado adicional del epítipo de anticuerpos anti-IL-3R $\alpha$ , se expresó en una célula una proteína quimérica en la que una región más pequeña que el dominio de región extramembránica de IL-3R $\alpha$  se substituyó por GM-CSFR $\alpha$ , y se analizó la afinidad de cada anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  por la célula. De forma breve, en primer lugar, se determinó una región que se consideró que estaba situada en el exterior en base a una predicción de la estructura tridimensional de la molécula de IL-3R $\alpha$ ; en segundo lugar, se construyeron respectivamente los vectores que expresan moléculas de IL-3R $\alpha$  en las que la región pequeña se substituyó por GM-CSFR $\alpha$ ; en tercer lugar, se expresaron de forma forzada en la célula HEK293F; y en cuarto lugar, se observó mediante citometría de flujo si cada anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  marcado con colorante fluorescente se une o no a aquella.

#### 10 (Cartografiado de los dominios de IL-3R $\alpha$ )

Entre los 3 dominios divididos según el ejemplo 7, se seleccionaron y se analizaron con detalle los dominios A y B que fueron reconocidos por los anticuerpos obtenidos Old19 y New102. En base a la estructura tridimensional de la cadena alfa del receptor de IL-4 (IL-4R $\alpha$ , CD124) (PDB: 3BPNC; cadena C, estructura cristalina del complejo ternario II4-II4r-II3ra), la estructura tridimensional de IL-3R $\alpha$  se sometió a modelado de homología usando SWISS-MODEL (<http://swissmodel.expasy.org/SWISS-MODEL.html>). La estructura predicha de la proteína IL-3R $\alpha$  se visualizó usando un software gráfico RasMol (<http://rasmol.org/>), y se determinaron 7 regiones que se consideró que estaban situadas en la región de aminoácidos extracelular de la molécula de IL-3R $\alpha$  (figura 4).

20 A fin de especificar el epítipo del anticuerpo humano anti-IL-3R $\alpha$  humana, se preparó y se expresó en la membrana celular una proteína en la que las regiones correspondientes de GM-CSFR $\alpha$  substituyeron a las 6 regiones de IL-3R $\alpha$  divididas como se describe en lo anterior, y se determinó la presencia o ausencia de la unión de los anticuerpos.

25 Usando como molde el AND plasmídico de IL-3RA-Flag/pEGFP-N1, se llevó a cabo la amplificación mediante un método de PCR que usa PrimeSTAR(R) HS DNA polymerase (TAKARABIO INC.). Con respecto a la PCR, se llevó a cabo una reacción de dos etapas a 98°C 10 segundos-68°C 5 minutos, 25 ciclos. Los cebadores de la PCR usados son los siguientes.

Deficiencia de la Región 1;

30 CD123-Fw21: CGTGGAACCCGCGAGTGAACAATAGCTATT (SEC ID NO:149)  
CD123-Re21: ACTCTGTTCTTTTTAACACACTCGATATCG (SEC ID NO:150)

Deficiencia de la Región 3;

35 CD123-Fw22: CTTTATCCAAATAACAGTGGGAAGCCTTG (SEC ID NO:151)  
CD123-Re22: CAGTTTCTGTTGGAATGGTGGGTTGGCCACT (SEC ID NO:152)

Deficiencia de la Región 4;

40 CD123-Fw23: AGGGAGGGTACCGGTGCGGAGAATCTGACCTGCT (SEC ID NO:153)  
CD123-Re23: TCCTGAATTTGGATAGAAGAGGATCCACGTGG (SEC ID NO:154)

Deficiencia de la Región 5;

45 CD123-Fw24: GGTCCGACGGCCCCCGCGGACGTCCAGTA (SEC ID NO: 155)  
CD123-Re24 : CCTCGCCCAGGTACAGCTCAAGAAATCCACGT (SEC ID NO:156)

Deficiencia de la Región 6;

50 CD123-Fw25: ACGGAACCAGCGCAGCCTTCGGTATCCCCT (SEC ID NO:157)  
55 CD123-Re25: TAACCAGAAAGTGGGAACCTTGAGAACC (SEC ID NO:158)

Deficiencia de la Región 7;

60 CD123-Fw26: TCTTTGATTCATTTGTCGTCTTTTCACA (SEC ID NO:159)  
CD123-Re26: ATTGGATGCCGAAGGCTGCGCTCCTGCCC (SEC ID NO:160)

65 El producto de la PCR así obtenido se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 0,8% (135 V, 15 minutos, tampón de TAE). El ADN se visualizó mediante tinción con bromuro de etidio. Tras confirmar la amplificación, la purificación se llevó a cabo usando Wizard SV Gel y PCR Clean-Up System. El ADN así obtenido se sometió a

fosforilación usando polinucleótido cinasa (New England Biolabs) y a precipitación con etanol, y después una parte del mismo se dejó reaccionar usando el kit de ligación de TaKaRa. Con respecto a la transformación, se mezclaron una muestra de ligación y célula competente DH10B, y se extendieron sobre una placa de LB (que contiene kanamicina). Se extrajo un ADN plasmídico a partir de la colonia así obtenida mediante el método Miniprep y se digirió con *XhoI* y *NotI*, y se verificó el inserto.

(Análisis mediante citometría de flujo de la célula que expresa la proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$  usando anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  marcado)

En la preparación de la célula que expresa la proteína quimérica IL-3R $\alpha$ /GM-CSFR $\alpha$  se usó la célula HEK293T. El ADN plasmídico obtenido en lo anterior se introdujo en un vector de expresión en la HEK293T. La HEK293T con el vector de expresión introducido se cultivó en un entorno de 5% de CO<sub>2</sub> y 37°C, y se usó en el análisis de citometría de flujo 2 días después de la introducción.

Cada uno de los anticuerpos humanos marcados con Alexa Flour488 o anticuerpos de ratón anti-IL-3R $\alpha$  marcados con FITC comercialmente disponibles (7G3 y 9F5: ambos disponibles de BD Biosciences, 6H6: de Acris Antibodies), a una concentración de 1  $\mu$ g/ml, se dejó reaccionar durante 30 minutos en hielo con 10.000 a 1.000.000 células de la célula que expresa la proteína quimérica. Para diluir los anticuerpos y las células, se usó un medio de tinción (PBS de Dulbecco que contiene 2% de suero fetal de ternera, 2 mM de EDTA y 0,05% de NaN<sub>3</sub>). A continuación, las células que reaccionaron con cada anticuerpo se lavaron 3 veces con el medio de tinción, y se confirmó mediante citometría de flujo si el anticuerpo marcado se unió o no a las células.

Los resultados se muestran en la figura 3. La reacción del anticuerpo c7G3 desapareció solamente en el caso de la célula que expresa la proteína en la que la región 1 se sustituyó por GM-CSFR $\alpha$ . La reacción del Old19 desapareció en el caso de la célula que expresa la proteína en la que la región 3 y la región 4 en el dominio A, y la región 6 y la región 7 en el dominio B, se sustituyeron por GM-CSFR $\alpha$ . La reacción del New102 desapareció en el caso de la célula que expresa la proteína en la que la región 6 y la región 7 del dominio B se sustituyó por GM-CSFR $\alpha$ .

Basándose en lo expuesto anteriormente, se demostró la posibilidad de que el anticuerpo Old19 reconoció las regiones 3 y 4 del dominio A y las regiones 6 y 7 del dominio B, y que el anticuerpo New102 reconoció las regiones 6 y 7 del dominio B. Los resultados anteriores se resumen como la Tabla 4.

[Tabla 4]

Región (dominio)	Secuencia reemplazante	7G3	9F5	6H6	Old19	New102
Región 1 (A)	55-DADYSMP-61	-	++	++	++	++
Región 3 (A)	91-STWILFPE-98	++	++	++	-	++
Región 4 (A-B)	97-PENSGKPW-104	++	++	++	-	++
Región 5 (B)	122-CSWAVGP-128	++	++	++	++	++
Región 6 (B)	182-ILVRGRS-188	++	++	++	-	-
Región 7 (B)	192-GIPCTDK-198	++	++	++	-	-

### Aplicabilidad industrial

Según la invención, se proporciona un anticuerpo contra la proteína IL-3R $\alpha$  humana (otro nombre: CD123 humana) y un agente terapéutico y un agente de diagnóstico para tumores malignos mielocíticos, particularmente leucemia mieloide aguda (AML), que comprende un anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$  humana como principio activo.

### Texto libre de listado de secuencias

SEC ID NO : 3 : cebador IL-3R $\alpha$ \_Fw  
 SEC ID NO : 4 : cebador IL-3R $\alpha$ \_Re  
 SEC ID NO : 5 : cebador IL-3R $\alpha$ \_seqF1  
 SEC ID NO : 6 : Inserto (*MefI* a *NotI*)  
 SEC ID NO : 7 : cebador Rhe123Fw1  
 SEC ID NO : 8 : cebador Rhe123Rv1  
 SEC ID NO : 9 : cebador T7  
 SEC ID NO : 10 : cebador SP6  
 SEC ID NO : 11 : Inserto (*MefI* a *NotI*) de IL-3R $\alpha$  de *Macaca fascicularis*  
 SEC ID NO : 12 : Inserto (*MefI* a *NotI*) de IL-3R $\alpha$  de *Macaca mulatta*  
 SEC ID NO : 13 : cebador hIL-3R $\alpha$ sol-FLAG-NotI  
 SEC ID NO : 14 : Inserto (*MefI* a *NotI*)  
 SEC ID NO : 15 : cebador hh-6  
 SEC ID NO : 16 : cebador hh-3  
 SEC ID NO : 17 : cebador hh-4

## ES 2 550 639 T3

SEC ID NO : 18 : cebador Fw específico de la cadena pesada de Old4  
 SEC ID NO : 19: cebador Rv específico de la cadena pesada de Old4  
 SEC ID NO : 20 : cebador Fw específico de la cadena pesada de Old5  
 SEC ID NO : 21 : cebador Rv específico de la cadena pesada de Old5  
 5 SEC ID NO : 22 : cebador Fw específico de la cadena pesada de Old 17  
 SEC ID NO : 23 : cebador Rv específico de la cadena pesada de Old 17  
 SEC ID NO : 24 : cebador Fw específico de la cadena pesada de Old 19  
 SEC ID NO : 25 : cebador Rv específico de la cadena pesada de Old 19  
 SEC ID NO : 26 : cebador Fw específico de la cadena pesada de New102  
 10 SEC ID NO : 27 : cebador Rv específico de la cadena pesada de New102  
 SEC ID NO : 28 : cebador Fw específico de la cadena pesada de Old6  
 SEC ID NO : 29 : cebador Rv específico de la cadena pesada de Old6  
 SEC ID NO : 30 : cebador mH\_Rv1  
 SEC ID NO : 31 : cebador mH\_Rv2  
 15 SEC ID NO : 32 : cebador Fw específico de la cadena pesada de 7G3  
 SEC ID NO : 33 : cebador Rv específico de la cadena pesada de 7G3  
 SEC ID NO : 34 : cebador hk-2  
 SEC ID NO : 35 : cebador hk-6  
 SEC ID NO : 36 : cebador Fw específico de la cadena ligera de Old4  
 20 SEC ID NO : 37 : cebador Rv específico de la cadena ligera de Old4  
 SEC ID NO : 38 : cebador Fw específico de la cadena ligera de Old5  
 SEC ID NO : 39 : cebador Rv específico de la cadena ligera de Old5  
 SEC ID NO : 40 : cebador Fw específico de la cadena ligera de Old17  
 SEC ID NO : 41 : cebador Rv específico de la cadena ligera de Old17  
 25 SEC ID NO : 42 : cebador Fw específico de la cadena ligera de Old19  
 SEC ID NO : 43 : cebador Rv específico de la cadena ligera de Old19  
 SEC ID NO : 44 : cebador Fw específico de la cadena ligera de New102  
 SEC ID NO : 45 : cebador Rv específico de la cadena ligera de New102  
 SEC ID NO : 46 : cebador Fw específico de la cadena ligera de Old6  
 30 SEC ID NO : 47 : cebador Rv específico de la cadena ligera de Old6  
 SEC ID NO : 48 : cebador mK\_Rv1  
 SEC ID NO : 49 : cebador mK\_Rv2  
 SEC ID NO : 50 : cebador Fw específico de la cadena ligera de 7G3  
 SEC ID NO : 51 : cebador Rv específico de la cadena ligera de 7G3  
 35 SEC ID NO : 80 : cebador hCD116Fw-Mfel  
 SEC ID NO : 81 : cebador hCD116Rv-NotI  
 SEC ID NO : 82 : cebador hCD116Fw-Mfel  
 SEC ID NO : 83 : cebador hCD116Rv-NotI  
 SEC ID NO : 84 : cebador hCD116Fw-Mfel  
 40 SEC ID NO : 85 : cebador hCD116Rv-NotI  
 SEC ID NO : 86 : cebador hCD116SeqFw1  
 SEC ID NO : 87 : cebador hCD116SeqFw2  
 SEC ID NO : 88 : cebador hCD116SeqRv1  
 SEC ID NO : 89 : cebador T7  
 45 SEC ID NO : 90 : cebador hCD123-C-FLAG-R1  
 SEC ID NO : 91 : cebador IL-3R $\alpha$ \_Fw  
 SEC ID NO : 92 : cebador C-FLAG-NotR2  
 SEC ID NO : 93 : cebador pEGFP-N1-Fw  
 SEC ID NO : 94 : cebador pEGFP-N1-Re  
 50 SEC ID NO : 95 : cebador pEGFP-N1-Fw  
 SEC ID NO : 96 : cebador pEGFP-N1-Re  
 SEC ID NO : 97 : cebador CD123R11pEGFPN1  
 SEC ID NO : 98 : cebador CD123F11  
 SEC ID NO : 99 : cebador CD123R12-2  
 55 SEC ID NO : 100 : cebador CD123F12-2  
 SEC ID NO : 101 : cebador CD123R13  
 SEC ID NO : 102 : cebador CD123F13  
 SEC ID NO : 103 : cebador pEGFP-N1-Fw  
 SEC ID NO : 104 : cebador -N1-Re  
 60 SEC ID NO : 105 : cebador GM-CSFRF11  
 SEC ID NO : 106 : cebador GM-CSFR11  
 SEC ID NO : 107 : cebador GM-CSFRF 12  
 SEC ID NO : 108 : cebador GM-CSFR12  
 SEC ID NO : 109 : cebador GM-CSFRF13  
 65 SEC ID NO : 110 : cebador GM-CSFR13  
 SEC ID NO : 111 : cebador pEGFP-N1-Fw

SEC ID NO : 112 : cebador pEGFP-N1-Re  
 SEC ID NO : 149 : cebador CD 123-Fw21  
 SEC ID NO: 150 : cebador CD123-Re21  
 SEC ID NO : 151 : cebador CD123-Fw22  
 5 SEC ID NO : 152 : cebador CD123-Re22  
 SEC ID NO: 153 : cebador CD123-Fw23  
 SEC ID NO: 154 : cebador CD123-Re23  
 SEC ID NO : 155 : cebador CD123-Fw24  
 SEC ID NO : 156 : cebador CD 123-Re24  
 10 SEC ID NO: 157 : cebador CD 123-Fw25  
 SEC ID NO : 158 : cebador CD123-Re25  
 SEC ID NO: 159 : cebador CD123-Fw26  
 SEC ID NO : 160 : cebador CD123-Re26

15 **Listado de secuencias**

<110> Kyowa Hakko Krin Co., Ltd

20 <120> Anticuerpo anti-IL-3R $\alpha$ 203 para el tratamiento de tumores de la sangre

<130> 1001P12041

<150> US 61/172923

25 <151> 2009-04-27

<160> 160

<170> PatentIn version 3.3

30 <210> 1

<211> 378

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35 <400> 1

```

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu
 1                5                10                15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met
                20                25                30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr
 35                40                45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn
 50                55                60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn
 65                70                75                80
    
```

ES 2 550 639 T3

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe  
 85 90 95  
 Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys  
 100 105 110  
 Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro  
 115 120 125  
 Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn  
 130 135 140  
 Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly  
 145 150 155 160  
 Thr Arg Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly  
 165 170 175  
 Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly  
 180 185 190  
 Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu  
 195 200 205  
 Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met  
 210 215 220  
 His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu  
 225 230 235 240  
 Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp  
 245 250 255  
 Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile  
 260 265 270  
 Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro  
 275 280 285  
 Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp  
 290 295 300  
 Arg Thr Ser Leu Leu Ile Ala Leu Gly Thr Leu Leu Ala Leu Val Cys  
 305 310 315 320  
 Val Phe Val Ile Cys Arg Arg Tyr Leu Val Met Gln Arg Leu Phe Pro  
 325 330 335  
 Arg Ile Pro His Met Lys Asp Pro Ile Gly Asp Ser Phe Gln Asn Asp  
 340 345 350

ES 2 550 639 T3

Lys Leu Val Val Trp Glu Ala Gly Lys Ala Gly Leu Glu Glu Cys Leu  
 355 360 365

Val Thr Glu Val Gln Val Val Gln Lys Thr  
 370 375

<210> 2

<211> 308

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Leu Trp Leu Thr Leu Leu Leu Ile Ala Leu Pro Cys Leu  
 1 5 10 15

Leu Gln Thr Lys Glu Asp Pro Asn Pro Pro Ile Thr Asn Leu Arg Met  
 20 25 30

Lys Ala Lys Ala Gln Gln Leu Thr Trp Asp Leu Asn Arg Asn Val Thr  
 35 40 45

Asp Ile Glu Cys Val Lys Asp Ala Asp Tyr Ser Met Pro Ala Val Asn  
 50 55 60

Asn Ser Tyr Cys Gln Phe Gly Ala Ile Ser Leu Cys Glu Val Thr Asn  
 65 70 75 80

Tyr Thr Val Arg Val Ala Asn Pro Pro Phe Ser Thr Trp Ile Leu Phe  
 85 90 95

Pro Glu Asn Ser Gly Lys Pro Trp Ala Gly Ala Glu Asn Leu Thr Cys  
 100 105 110

Trp Ile His Asp Val Asp Phe Leu Ser Cys Ser Trp Ala Val Gly Pro  
 115 120 125

Gly Ala Pro Ala Asp Val Gln Tyr Asp Leu Tyr Leu Asn Val Ala Asn  
 130 135 140

Arg Arg Gln Gln Tyr Glu Cys Leu His Tyr Lys Thr Asp Ala Gln Gly  
 145 150 155 160

Thr Arg Ile Gly Cys Arg Phe Asp Asp Ile Ser Arg Leu Ser Ser Gly  
 165 170 175

Ser Gln Ser Ser His Ile Leu Val Arg Gly Arg Ser Ala Ala Phe Gly  
 180 185 190

Ile Pro Cys Thr Asp Lys Phe Val Val Phe Ser Gln Ile Glu Ile Leu  
 195 200 205

Thr Pro Pro Asn Met Thr Ala Lys Cys Asn Lys Thr His Ser Phe Met  
 210 215 220

10

ES 2 550 639 T3

His Trp Lys Met Arg Ser His Phe Asn Arg Lys Phe Arg Tyr Glu Leu  
 225 230 235 240

Gln Ile Gln Lys Arg Met Gln Pro Val Ile Thr Glu Gln Val Arg Asp  
 245 250 255

Arg Thr Ser Phe Gln Leu Leu Asn Pro Gly Thr Tyr Thr Val Gln Ile  
 260 265 270

Arg Ala Arg Glu Arg Val Tyr Glu Phe Leu Ser Ala Trp Ser Thr Pro  
 275 280 285

Gln Arg Phe Glu Cys Asp Gln Glu Glu Gly Ala Asn Thr Arg Ala Trp  
 290 295 300

Arg Thr Ser Leu  
 305

5 <210> 3  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> cebador IL-3RA\_Fw

<400> 3  
 cggcaattgc caccatggc ctccttggc tcac 34

15 <210> 4  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> IL-3RA\_Re

<400> 4  
 25 attgcgccg ctcaagttt ctgcacgacc t 31

<210> 5  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador IL-3RA\_seqF1

<400> 5  
 35 gtcttacta caaaacggat 20

<210> 6  
 <211> 1156  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> secuencia de inserto

45

ES 2 550 639 T3

	<400> 6		
	caattgccac catggtcctc ctttggctca cgctgctcct gatcgccctg ccctgtctcc	60	
	tgcaaacgaa ggaagatcca aaccacacaa tcacgaacct aaggatgaaa gcaaaggctc	120	
	agcagttgac ctgggacctt aacagaaatg tgaccgatat cgagtgtggt aaagacgccg	180	
	actattctat gccggcagtg aacaatagct attgccagtt tggagcaatt tccttatgtg	240	
	aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca acccaccatt ctccacgtgg atcctcttcc	300	
	ctgagaacag tgggaagcct tgggcagggt cggagaatct gacctgctgg attcatgacg	360	
	tggatttctt gagctgcagc tggggcggtag gcccgggggc ccccgccggac gtccagtacg	420	
	acctgtactt gaacgttgcc aacaggcgtc aacagtacga gtgtcttcac tacaaaacgg	480	
	atgctcaggg aacacgtatc ggggtgctgt tcgatgacat ctctcgactc tccagcggtt	540	
	ctcaaagttc ccacatcctg gtgcggggca ggagcgcagc cttcggtate ccctgcacag	600	
	ataagttgt cgtcttttca cagattgaga tattaactcc acccaacatg actgcaaagt	660	
	gtaataagac acattccttt atgcactgga aatgagaag tcatttcaat cgcaaatttc	720	
	gctatgagct tcagatacaa aagagaatgc agcctgtaat cacagaacag gtcagagaca	780	
	gaacctcctt ccagctactc aatcctggaa cgtacacagt acaataaga gcccgggaaa	840	
	gagtgatga attcttgagc gcctggagca cccccagcg cttcgagtgc gaccaggagg	900	
	agggcgcaaa cacacgtgcc tggcggacgt cgctgctgat cgcgctgggg acgctgctgg	960	
	ccctggtctg tgtcttcgtg atctgcagaa ggtatctggt gatgcagaga ctctttcccc	1020	
	gcacccctca catgaaagac cccatcgggt acagcttcca aaacgacaag ctggtggtct	1080	
	gggaggcggg caaagccggc ctggaggagt gtctggtgac tgaagtacag gtcgtgcaga	1140	
	aaacttgagc ggccgc	1156	
5	<210> 7 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial		
10	<220> <223> cebador Rhe123Fw1		
15	<400> 7 cggcaattgc caccatgacc ctctttggc tgacgctg	38	
20	<210> 8 <211> 38 <212> ADN <213> Artificial		
	<220> <223> cebador Rhe123Rv1		
25	<400> 8 tatattgagg ccgctcaagt ttctccacc acctgcac	38	
30	<210> 9 <211> 20 <212> ADN <213> Artificial		
	<220>		

ES 2 550 639 T3

<223> cebador T7

<400> 9  
 taatacgact cactataggg 20

5

<210> 10  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10

<220>  
 <223> cebador SP6

<400> 10  
 gatttagtg acactatag 19

15

<210> 11  
 <211> 1156  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> secuencia de inserto

25

<400> 11  
**caattgccac catgaccctc ctttggctga cgctgctcct ggtegccacg ccctgtctcc 60**  
**tgcaaacgaa ggaggatcca aatgcaccaa tcaggaatct aaggatgaaa gaaaaggctc 120**  
**agcagttgat gtgggacctg aacagaaacg tgaccgacgt ggagtgtatc aaaggcaccg 180**  
**actattctat gccggcaatg aacaacagct attgccagtt cggagccatt tccttatgtg 240**  
**aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca gtcccccggt ctccacgtgg atcctcttcc 300**  
**ctgagaacag tgggacgcct caggcaggcg cggagaatct gacctgctgg gtccatgacg 360**  
**tggatttett gagctgcagc tgggtggcag gcccggcggc ccccgetgac gtccagtacg 420**  
**acctgtactt gaacaatccc aacagccacg aacagtacag gtgccttcac taaaaacgg 480**  
**atgctcgggg aacacagatc ggggtgcggt togatgacat cgctcgactc tcccgcggtt 540**  
**ctcaaagttc ccacatcctg gtgaggggca ggagcgcagc cgtcagtatc ccctgcacag 600**  
**ataagtttgt cttcttttca cagattgaga gattaactcc acccaacatg actggagagt 660**  
**gtaatgagac acattccttc atgcaactgga aatgaaaag tcatttcaat cgcaaattcc 720**  
**gctatgagct tcggatccaa aagagaatgc agcctgtaag gacagaacag gtcagagaca 780**  
**caacctcctt ccagctacce aatcctggaa cgtacacagt gcaaataaga gcccgggaaa 840**  
**cagtgtatga attcttgagt gcctggagca cccccagcg cttecgagtgc gaccaggagg 900**  
**agggcgcgag ctgcgctgcc tggcggacgt cgctgctgat cgcgctgggg acgctgctgg 960**  
**ccttgetctg tgtgttctc atctgcagaa ggtatctggt gatgcagagg ctgtttcccc 1020**  
**gcatcccaca catgaaagac cccatcgggt acacctcca acaggacaag ctggtggtct 1080**  
**gggagggcggg caaagccggc ctggaggagt gtctggtgtc tgaagtgcag gtggtggaga 1140**  
**aaacttgagc ggccgc 1156**

<210> 12  
 <211> 1156  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

ES 2 550 639 T3

<220>

<223> secuencia de inserto

5 <400> 12  
 caattgccac catgaccctc ctttggctga cgctgctcct ggtcgccacg cctgtctcc 60  
 tgcaaaccaa ggaggatcca aatgcaccaa tcaggaatct aaggatgaaa gaaaaggctc 120  
 agcagttgat gtgggacctg aacagaaaacg tgaccgacgt ggagtgtatc aaaggcaccg 180  
 actattctat gccggcaatg aacgacagct attgccagtt cggagccatt tccttatgtg 240  
 aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca gtccctcgtt ctccacgtgg atcctcttcc 300  
 ctgagaacag tgggacgcct cgggcaggcg cggagaattt gacctgctgg gttcatgacg 360  
 tggatttctt gagctgcagc tgggtggtag gcccggcggc ccccgtgac gtccagtacg 420  
 acctgtactt gaacaatccc aacagccacg aacagtacag gtgccttcgc taaaaacgg 480  
 atgctcgggg aacacagatc ggggtgctggt tcgatgacat cgctcgactc tcccggggtt 540  
 ctcaaagttc ccacatcctg gtgaggggca ggagcgcagc cgtcagtatc ccctgcacag 600  
 ataagtttgt cttcttttca cagattgaga gattaactcc acccaacatg actggagagt 660  
 gtaatgagac acattccttc atgcactgga aatgaaaag tcatttcaat cgcaaattcc 720  
 actatgagct tcggatccaa aagagaatgc agcctgtaag gacagaacag gtcagagaca 780  
 caacctcctt ccagctaccc aatcctggaa cgtacacagt gcaaataaga gcccgggaaa 840  
 cagtgtatga attcttgagt gcctggagca cccccagcg cttcgagtgc gaccaggagg 900  
 agggcgcgag ctccgctgcc tggcggacgt cgctgctgat cgcgctgggg acgctgctgg 960  
 ccttgetctg tgtgttctc atctgcagaa ggtatctggt gatgcagagg ctgtttcccc 1020  
 gcatcccaca catgaaagac cccatcgggt acaccttcca acaggacaag ctggtggtct 1080  
 gggaggcggg caaagccggc ctggaggagt gtctggtgtc tgaagtgcag gtggtggaga 1140  
 aaacttgagc ggccgc 1156

<210> 13

<211> 58

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> cebador hIL-3RAsol-FLAG-NotI

15

<400> 13

attcggccg ctacttatc gtcgtatcc ttgtagtccc gccaggcagc tgtgttg 58

<210> 14

20 <211> 961

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> secuencia de inserto

ES 2 550 639 T3

<400> 14  
caattgccac catggctcct ctttggtcct cgctgctcct gatcgccctg cctgtctctc 60  
tgcaaacgaa ggaagatcca aaccaccaa tcacgaacct aaggatgaaa gcaaaggctc 120  
agcagttgac ctgggacctt aacagaaatg tgaccgatat cgagtgtggt aaagacgccg 180  
actattctat gccggcagtg aacaatagct attgccagtt tggagcaatt tccttatgtg 240  
aagtgaccaa ctacaccgtc cgagtggcca acccaccatt ctccacgtgg atcctcttcc 300  
ctgagaacag tgggaagcct tgggcagggt cggagaatct gacctgctgg attcatgacg 360  
tggatttctt gagctgcagc tggggcgtag gcccgggggc ccccggggac gtccagtacg 420  
acctgtactt gaacgttgcc aacaggcgtc aacagtacga gtgtcttcac tacaaaacgg 480  
atgctcaggg aacacgtatc ggggtgctgt tcgatgacat ctctcgactc tccagcggtt 540  
ctcaaagtcc ccacatcctg gtgcggggca ggagcgcagc cttcggtatc cctgacacag 600  
ataagtttgt cgtcttttca cagattgaga tattaactcc acccaacatg actgcaaagt 660  
gtaataagac acattccttt atgcactgga aatgagaag tcatttcaat cgcaaatttc 720  
gctatgagct tcagatacaa aagagaatgc agcctgtaat cacagaacag gtcagagaca 780  
gaacctcctt ccagctactc aatcctggaa cgtacacagt acaaataaga gcccgggaaa 840  
gagtgatga attcttgagc gcctggagca cccccagcg cttcgagtgc gaccaggagg 900  
agggcgcaaa cacacgtgcc tggcgggact acaaggatga cgacgataag tgagcggccg 960  
c 961

5 <210> 15  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> cebador hh-6

<400> 15  
ggtccgggag atcatgaggg tgcctt 27

15 <210> 16  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> cebador hh-3

<400> 16  
gtgcacgccg ctggtcaggg cgctg 26

25 <210> 17  
<211> 23  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> cebador hh-4

35 <400> 17  
ggtgccaggg ggaagaccga tgg 23

<210> 18

# ES 2 550 639 T3

<211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de Old4

<400> 18  
 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cctctttgt 49

10 <210> 19  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de Old4

<400> 19  
 20 agagagagag gctagctgaa gagacgggta ccattgtccc 40

<210> 20  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de Old5

<400> 20  
 30 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cctctttgt 49

<210> 21  
 <211> 40  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de Old5

<400> 21  
 40 agagagagag gctagctgaa gagacgggta ccattgtccc 40

<210> 22  
 <211> 49  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de Old17

<400> 22  
 50 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cctctttgt 49

<210> 23  
 <211> 41  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de Old 17

<400> 23  
 60 agagagagag gctagctgag gagacgggta caaggggtcc c 41

<210> 24

# ES 2 550 639 T3

<211> 49  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de Old19

<400> 24  
 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cctctttgt 49

10 <210> 25  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de Old19

<400> 25  
 20 agagagagag gctagctgag gagacgggta ccagggttc 39

<210> 26  
 <211> 49  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de New102

<400> 26  
 30 agagagagag gtcgaccacc atggactgga cctggagggt cctctttgt 49

<210> 27  
 <211> 38  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de New102

<400> 27  
 40 agagagagag gctagctgag gagacgggta ccagggttc 38

<210> 28  
 <211> 41  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 50 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de Old6

<400> 28  
 agagagagag gtcgaccac catggaactg gggctccgct g 41

<210> 29  
 <211> 39  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 60 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de Old6

<400> 29  
 agagagagag gctagctgag gagacgggta ccagggttc 39

65 <210> 30

ES 2 550 639 T3

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador mH\_Rv1

<400> 30  
 atttgtcga ckygtsyt gctggcyggg tg 32

10 <210> 31  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador mH\_Rv2

20 <400> 31  
 gcacacyrct ggacaggat ccagagttcc 30

25 <210> 32  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena pesada de 7G3

30 <400> 32  
 agagagagag gtcgaccacc atgggatgga gctggatctt tctc 44

35 <210> 33  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena pesada de 7G3

<400> 33  
 agagagagag gctagctgca gagacagtga ccagagtccc 40

45 <210> 34  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

50 <220>  
 <223> cebador hk-2

<400> 34  
 gttgaagctc ttgtgacgg gcgagc 26

55 <210> 35  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> cebador hk-6

<400> 35  
 tggcgggaag atgaagacag atggtg 26

65 <210> 36

# ES 2 550 639 T3

	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de Old4	
	<400> 36	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tcagc	45
10	<210> 37	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de Old4	
	<400> 37	
20	agagagagag cgtacgttg atctccagct tggccccctg	40
	<210> 38	
	<211> 45	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de Old5	
30	<400> 38	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggccccgc tcagc	45
	<210> 39	
	<211> 40	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de Old5	
40	<400> 39	
	agagagagag cgtacgttg atctccagct tggccccctg	40
	<210> 40	
45	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de Old17	
	<400> 40	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggctctcgc tcag	44
55	<210> 41	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de Old17	
	<400> 41	
	agagagagag cgtacgttg atctccagct tggccccctg	40
65	<210> 42	

# ES 2 550 639 T3

	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de Old19	
	<400> 42	
10	agagagagag atctctcacc atggacatga gggctctcgc tcag	44
	<210> 43	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de Old19	
	<400> 43	
20	agagagagag cgtacgttg attccacct tggcccttg gc	42
	<210> 44	
	<211> 44	
	<212> ADN	
25	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de New102	
30	<400> 44	
	agagagagag atctctcacc atggacatga gggctctcgc tcag	44
	<210> 45	
	<211> 40	
35	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de New102	
40	<400> 45	
	agagagagag cgtacgttg atctccagct tggcccctg	40
	<210> 46	
45	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
50	<223> cebador Fw específico para la cadena ligera de Old6	
	<400> 46	
	gagagagaga tctctacca tggacatgag ggtcccgcct cagc	44
55	<210> 47	
	<211> 42	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador Rv específico para la cadena ligera de Old6	
	<400> 47	
65	agagagagag cgtacgttg atatccact tggcccagg gc	42
	<210> 48	

ES 2 550 639 T3

<211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> cebador mK\_Rv1

<400> 48  
 ttgaagctct tgacaatggg tgaagttgat 30

10 <210> 49  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador mK\_Rv2

20 <400> 49  
 gtaggtgctg tctttgctgt cctgatcagt 30

25 <210> 50  
 <211> 44  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> cebador Fw específico para la cadena ligera de 7G3

30 <400> 50  
 agagagagag agatctcacc atggaatcac agactcaggt cctc 44

35 <210> 51  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> cebador Rv específico para la cadena ligera de 7G3

<400> 51  
 agagagagag cgtacgtttt atttcagct tggcccccc 40

45 <210> 52  
 <211> 443  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 52  
**gacccgtcga ccacatgga ctggacctgg aggttctctt ttgtggtggc agcagctaca 60**  
**ggtgtccagt cccaggtcca gctgctacag tctggggctg aggtgaagaa gcctgggtcc 120**  
**tccgtgaagg tctcatgcaa ggcttctgga ggcacctca gcacctatgc tadcagctgg 180**  
**gtgcgacagg cccctggaca agggottgag tggatgggag ggatcatccc tatctttggt 240**  
**atagtaaact acgcacagaa gttccagggc agagtcacga ttaccgcgga cgaatccacg 300**  
**agtacagcct acatggaact gaggcagcct agatctgagg acacggccgt gtattattgt 360**  
**gcgagagggg ggggctcggg cccagatggt cttgatatct ggggccaagg gacaatggtc 420**  
 50 **accgtctctt cagctagcac caa 443**

<210> 53  
 <211> 143

ES 2 550 639 T3

<212> PRT  
<213> Homo sapiens

5 <220>  
<221> característica diversa  
<222> (143)..(143)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 53  
Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

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

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

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

Glu Trp Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile  
115 120 125

10 Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Xaa  
130 135 140

<210> 54  
<211> 412  
<212> ADN  
15 <213> Homo sapiens

<400> 54  
cacagatctc tcaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcttggggct cctgctgctc 60  
tggtcccag gtgccagatg tgcacatctgg atgaccagct ctccatcctt actctctgca 120  
tctacaggag acagagtcac catcagttgt cggatgagtc agggcattag gagttattta 180  
gcctggtatc agcaaaaacc agggaaagcc cctgagctcc tgatctatgc tgcattccact 240  
ttgcaaagtg gggctccatc aaggttcagt ggcagtgat ctgggacaga tttcactctc 300  
accatcagca gcctgcagtc tgaagatttt gcaacttatt actgtcaaca gtattatagt 360  
ttcccgtaca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aacgtacggt gg 412

20 <210> 55  
<211> 133  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

25 <220>

<221> característica diversa  
 <222> (133)..(133)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

5 <400> 55  
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu  
 20 25 30  
 Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser  
 35 40 45  
 Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys  
 50 55 60  
 Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
 85 90 95  
 Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
 115 120 125  
 Lys Arg Thr Val Xaa  
 130

10 <210> 56  
 <211> 433  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 56  
 gtcgaccacc atggactgga cctggaggtt cctctttgtg gtggcagcag ctacaggtgt 60  
 ccagtcccag gtccagctgg tgcagtctgg ggctgaggtg aagaagcctg ggtcctcggg 120  
 gaaggtctca tgcaaggctt ctggaggcac cttcagcacc tatgctatca gctgggtgcg 180  
 acaggccctt ggacaagggc ttgagtggat gggagggctc atccctatct ttgatataga 240  
 aaactacgca cagaagttcc agggcagagt caccgattacc gcggacgaat ccacgagcac 300  
 agtctatatg gaactgagca gcctgagatc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcgag 360  
 aggggggggt tcgggccctg atgttcttga tatctggggc caagggacaa tggtcaccgt 420  
 ctcttcagct agc 433

15 <210> 57  
 <211> 141  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20

ES 2 550 639 T3

<400> 57

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

<210> 58

- 5 <211> 412
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 58

cacagatctc tcaccatgga catgagggtc cccgctcagc tcctggggct cctgctgctc 60  
 tggctcccag gtgccagatg tgtcatctgg atgacceagt ctccatcctt actctctgca 120  
 tctacaggag acagagtcac catcagttgt cggatgagtc agggcattag gagttattta 180  
 gcctggtatc agcaaaaacc agggaaagcc cctgagctcc tgatctatgc tgcacccact 240  
 ttgcaaagtg ggggtcccatc aaggttcagt ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc 300  
 accatcagca gctgcagtc tgaagatatt gcaacttatt actgtcaaca gtattatagt 360  
 10 ttcccgtaca cttttggcca ggggaccaag ctggagatca aacgtacggt gg 412

<210> 59

- <211> 133
- <212> PRT
- 15 <213> Homo sapiens

<220>

- <221> característica diversa
- <222> (133)..(133)
- 20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 550 639 T3

<400> 59

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

Leu Pro Gly Ala Arg Cys Val Ile Trp Met Thr Gln Ser Pro Ser Leu  
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Met Ser  
35 40 45

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

Ala Pro Glu Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val  
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

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

Lys Arg Thr Val Xaa  
130

- 5 <210> 60
- <211> 438
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 60

gaccgctcga ccaccatgga ctggacctgg aggttctctt ttgtggtggc agcagctaca 60  
 ggtgtccagt cccaggtcca gctggtgcag tctggggctg aggtgaagaa gcctgggtcc 120  
 tcggtgaagg tctcctgcaa gacttctgga ggcacctca gcaactttgc ttcagctgg 180  
 gtgcgacagg cccttgaca agggcttgag tggatgggag ggatcatccc tatctttggt 240  
 tcaacaaact acgcacagaa gttccagggc agagtcacga ttaacgcgga cgaatccacg 300  
 10 agcacagcct acatggagct gagcagctctg agatctgagg acacggccgt gtattactgt 360  
 gggggtggag acaaatatgg tccttactac tttcactact ggggccaggg aacccttgtc 420  
 accgtctcct cagctagc 438

- 15 <210> 61
- <211> 141
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 61

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln 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 Thr Ser Gly Gly Thr Phe  
35 40 45

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

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

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Asn Ala Asp Glu 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 Gly Gly Asp Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe His Tyr  
115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser  
130 135 140

<210> 62

5 <211> 407

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 62

agatctctca ccatggacat gagggctctc gctcagctcc tggggctcct gctgctctgt 60

ttcccagggtg ccagatgtga catccagatg acccagctctc catctcact gtctgcatct 120

gtaggagaca gagtcaacat cacttgctcg gcgagtcagg gtattagcag ctggtagcc 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagcccct aagtcctga tctatgctgc atccagttg 240

caaagtgggg tccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

10 atcagcagcc tgcagcctga agatthtga acttattact gccaacagta taatagttac 360

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac gtacggt 407

<210> 63

15 <211> 132

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

20 <221> característica diversa

<222> (132)..(132)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

ES 2 550 639 T3

<400> 63

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys  
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Thr Xaa  
130

- 5 <210> 64
- <211> 437
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 64

tcgaccccat ggactggacc tggagggtcc tctttgtggt ggcagcagct acaggtgtcc 60  
 agtcccaggt ccagctggtg cagtctgggg ctgaggtgaa gaagcctggg tcctcgggtga 120  
 10 aggtctcctg caaggttctt ggagggcact tcagcagcta tgctatcagc tgggtgagac 180  
 aggccctgg acaagggctt gagtgggtgg gagggatcat ccctatcttt ggtacagcaa 240  
 actacgcaca gaagtccag ggcagagtca cgattaccgc ggacgaatcc acgagcacag 300  
 cctacatgga gctgagcagc ctgagatctg aggacacggc cgtgtattac tgtgagagag 360  
 gacacaaata tggcccctac tactttgact actggggcca ggaaccctg gtcaccgtct 420  
 cctcagctag caccaag 437

- 15 <210> 65
- <211> 143
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 65

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln 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 Gly Thr Phe  
35 40 45

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

Glu Trp Val Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu 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 Gly His Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
115 120 125

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

<210> 66

5 <211> 411

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 66

agatctctca ccatggacat gagggctctc gctcagctcc tggggctcct gctgctctgt 60

ttcccaggtg ccagatgtga catccagatg acccagctc catcctcact gtctgcatct 120

10 gtaggagaca gaggcaccat caettgtcgg gcgagtcagg gtattagcag ctggttagec 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagcccct aagtcctga tctatgctgc atccagtttg 240

caaagtgggg tcccataag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagcc tgcagcctga agattttgca acttattact gccaacagta taatagttac 360

cctcggacgt tcggccaagg gaccaaggtg gaaatcaaac gtacggtggc t 411

<210> 67

15 <211> 133

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 67

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys  
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala  
130

<210> 68

5 <211> 435

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 68

tcgaccacca tggactggac ctggagggtc ctctttgtgg tggcagcagc tacaggtgtc 60

cagtcccagg tccagctggt gcagtctggg gctgaggtga agaagcctgg atcctcggtg 120

10 aaggtctcct gcatggcttc aggaggcacc gtcagcagct acgctatcag ctgggtgcga 180

caggcccctg gacaagggct tgagtggatg ggagagatca tccctatctt tggatatagta 240

aactacgcac agaagttcca gggcagagtc acgattaccg cggacgaatc cacgaacaca 300

gcctacatgg agctgagcag cctgagatct gaggacacgg ccatatatta ctgtgcgaga 360

gagacagcag tggtctggtat tcttggttac tggggccagg gaaccctggt caccgtctcc 420

tcagctagca ccaag 435

<210> 69

15 <211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 69

Met Asp Trp Thr Trp Arg Phe Leu Phe Val Val Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Val Gln 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 Met Ala Ser Gly Gly Thr Val  
35 40 45

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

Glu Trp Met Gly Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala  
65 70 75 80

Gln Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn  
85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Glu Thr Ala Val Ala Gly Ile Leu Gly Tyr Trp  
115 120 125

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

<210> 70

5 <211> 414

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 70

agatctctca ccatggacat gagggctctc gctcagctcc tggggctcct gctgctctgt 60

ttcccaggtg ccagatgtga catccagatg acccagctc cactcctcact gtctgcatct 120

10 gtaggagaca gagtcacat cacttgctcg gcgagtcagg gtattagcag ctggttagcc 180

tggtatcagc agaaaccaga gaaagcccct aagtcctga tctatgctgc atccagttg 240

caaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagcc tgcagcctga agattttgca acttattact gccaacagta taatagttac 360

ccgtacactt ttggccaggg gaccaagctg gagatcaaac gtacggtggc tgca 414

<210> 71

15 <211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 71

Met Asp Met Arg Val Leu Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Cys  
1 5 10 15

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

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

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

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

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile  
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala  
130

<210> 72

5 <211> 423

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 72

cgaccacca tggaactggg gctccgctgg gttttccttg ttgctatattt agaaggtgtc 60

cagtgtgagg tgcagttggt ggagtctggg ggaggcctgg tcaagcctgg ggggtccctg 120

10 agactctcct gtgcagcctc tggattcacc ttcagtagcc ataacatgaa ctgggtccgc 180

caggctccag ggaaggggct ggagtgggtc tcatccatta gtagtagtag tagttacata 240

tattatgcag actcagtgaa gggccgattc accatctcca gagacaacgc caagaactca 300

ctgtatctgc aaatgaacag cctgagagcc gaggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga 360

gaggactggg gctactttga ctactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctcagct 420

agc 423

<210> 73

15 <211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 73

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

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

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
35 40 45

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

Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala  
65 70 75 80

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

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

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

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

<210> 74

5 <211> 407

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 74

agatctctca ccatggacat gagggctccc gtcagctcc tggggcttct gctgctctgg 60

ctcccagggtg ccagatgtgc catccagttg acccagctc catcctccct gtctgcatct 120

10 gtaggagaca gagtcaecat cacttgccgg gcaagtcagg gcattagcag tgatttagcc 180

tggtatcagc agaaaccagg gaaagctcct aagctcctga tctatgatgc ctccagtttg 240

gaaagtgggg tcccatcaag gttcagcggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300

atcagcagcc tgcagcctga agattttgca acttattact gtcaacagtt taatagttac 360

ccattcactt tgggcccctgg gaccaaagtg gatatcaaac gtacggt 407

<210> 75

15 <211> 134

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 75

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

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

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

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

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val  
65 70 75 80

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr  
85 90 95

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln  
100 105 110

Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile  
115 120 125

Lys Arg Thr Val Ala Ala  
130

<210> 76

5 <211> 433

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 76

gtcgcaccacc atgggatgga gctggatcct tctctttctc gtgtcaggaa ctggagggtg 60

cctctctgag gtccagctgc aacagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt 120

10 aaagatgtcc tgcaaggctt ctggatacac cttcactgac tactacatga agtgggtgaa 180

acagagccat ggaaagagcc ttgagtggat tggagatatt attcctagca atggtgccac 240

tttctacaac cagaagttca agggcaaggc cactttgact gtggacagat cctccagcac 300

agcctacatg cacctcaaca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtacaag 360

atcgcattha ctgcgggcct cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt 420

ctctgcagct agc 433

<210> 77

15 <211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 77

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

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

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

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

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

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser  
 85 90 95

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

Tyr Tyr Cys Thr Arg Ser His Leu Leu Arg Ala Ser Trp Phe Ala Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser  
 130 135 140

<210> 78

- 5 <211> 412
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens

<400> 78

agatctcacc atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg 60

tacctgtggg gactttgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga 120

10 gaaggtcact atgagctgca agtctagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa 180

ctacttgacc tggtatctgc agaaccagg gcagcctcct aaattgttga tctattgggc 240

atccactagg gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt 300

cactctcacc atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga 360

ttatagttat cegtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gt 412

<210> 79

- 15 <211> 134
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens

ES 2 550 639 T3

<400> 79

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

Gly Thr Cys Gly Asp Phe Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr  
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser  
35 40 45

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

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg  
65 70 75 80

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

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

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr  
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
130

5 <210> 80  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Artificial

10 <220>  
<223> cebador hCD116Fw-Mfel

<400> 80  
cggcaattgc caccatgctt ctctgggta caagcct 37

15 <210> 81  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Artificial

20 <220>  
<223> cebador hCD116Rv-NotI

<400> 81  
attgaggccg ctgagtaattccttcacg g 31

25 <210> 82  
<211> 37  
<212> ADN  
<213> Artificial

30 <220>  
<223> cebador hCD116Fw-Mfel

35 <400> 82  
cggcaattgc caccatgctt ctctgggta caagcct 37

ES 2 550 639 T3

	<210> 83	
	<211> 31	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador hCD116Rv-NotI	
	<400> 83	
10	attgcggccg ctcaggtaat ttccttcacg g	31
	<210> 84	
	<211> 37	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador hCD116Fw-MfeI	
20	<400> 84	
	cggcaattgc caccatgctt ctctctgtga caagcct	37
	<210> 85	
	<211> 31	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador hCD116Rv-NotI	
30	<400> 85	
	attgcggccg ctcaggtaat ttccttcacg g	31
	<210> 86	
35	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador hCD116SeqFw1	
	<400> 86	
	tgaactgtac ctggcgagg	20
45	<210> 87	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador hCD116SeqFw2	
	<400> 87	
55	ctggcagcga aaacctactg	20
	<210> 88	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador hCD116SeqRv1	
	<400> 88	
65	cctgaattg gataaagcag	20

ES 2 550 639 T3

	<210> 89	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador T7	
	<400> 89	
10	taatacgact cactataggg	20
	<210> 90	
	<211> 40	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador hCD123-C-FLAG-R1	
20	<400> 90	
	tcgtcatcgt cctgtagtc agtttctgc acgacctgta	40
	<210> 91	
	<211> 34	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador IL-3RA_Fw	
30	<400> 91	
	cggcaattgc caccatggtc ctcccttggc tcac	34
	<210> 92	
35	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador C-FLAG-NotR2	
	<400> 92	
	aaaagcggcc gctcacttgt cgctcatcgtc cttgtagtc	39
45	<210> 93	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Fw	
	<400> 93	
55	cggtgacggg gggaggctca	20
	<210> 94	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Re	
	<400> 94	
65	tttatgttc aggttcagg	19

ES 2 550 639 T3

	<210> 95	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Fw	
	<400> 95	
10	cgtgtacggt gggaggctca	20
	<210> 96	
	<211> 19	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Re	
20	<400> 96	
	tttatgttc aggttcagg	9
	<210> 97	
	<211> 28	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador CD123R11pEGFPN1	
30	<400> 97	
	aaaggtaccg aattcgaagc ttgagctc	28
	<210> 98	
35	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador CD123F11	
	<400> 98	
	aaaggtaccg ggaagccttg ggcaggt	27
45	<210> 99	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador CD123R12-2	
	<400> 99	
55	aaaggtacca ctgtctcag ggaagaggat	30
	<210> 100	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador CD123F12-2	
	<400> 100	
65	aaaggtaccc agattgagat attaactcc	29

	<210> 101	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador CD123R13	
	<400> 101	
10	aaaggtacct gaaaagacga caaactt	27
	<210> 102	
	<211> 27	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador CD123F13	
	<400> 102	
20	aaaggtacct cgctgctgat cgcgctg	27
	<210> 103	
	<211> 20	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Fw	
30	<400> 103	
	cggtgacggt gggaggtcta	20
	<210> 104	
35	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador pEGFP-N1-Re	
	<400> 104	
	tttatgttc aggttcagg	19
45	<210> 105	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador GM-CSFRF11	
	<400> 105	
55	aaaggtaccg ccacatgct tctcctgggtg aca	33
	<210> 106	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador GM-CSFRF11	
	<400> 106	
65	aaaggtacct gaattggat aaagcag	27

ES 2 550 639 T3

	<210> 107	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> cebador GM-CSFRF12	
	<400> 107	
10	aaaggtaccg gaaggaggg taccgct	27
	<210> 108	
	<211> 27	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador GM-CSFRF12	
	<400> 108	
20	aaaggtaccc ttgtgtcca aaagtga	27
	<210> 109	
	<211> 27	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> cebador GM-CSFRF13	
30	<400> 109	
	aaaggtacca aaatagaacg attcaac	27
	<210> 110	
35	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> cebador GM-CSFRF13	
	<400> 110	
	aaaggtacca atgtacacag agccgag	27
45	<210> 111	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Fw	
	<400> 111	
55	cgtgtacggt gggaggctca	20
	<210> 112	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> cebador pEGFP-N1-Re	
	<400> 112	
65	tttatgttc aggttcagg	19

ES 2 550 639 T3

<210> 113  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 113  
**Thr Tyr Ala Ile Ser**  
**1 5**

<210> 114  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 10  
 <400> 114  
**Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

15 **Gly**  
 <210> 115  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20  
 <400> 115  
**Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile**  
**1 5 10**

25 <210> 116  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 30 <400> 116  
**Thr Tyr Ala Ile Ser**  
**1 5**

35 <210> 117  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 117  
**Gly Leu Ile Pro Ile Phe Asp Ile Glu Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

40 **Gly**  
 <210> 118  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 118  
**Gly Gly Gly Ser Gly Pro Asp Val Leu Asp Ile**  
**1 5 10**

50 <210> 119  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 55

<400> 119  
**Asn Phe Ala Ile Ser**  
 1 5

5 <210> 120  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 120  
**Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**  
 1 5 10 15

10 **Gly**

<210> 121  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 121  
**Gly Asp Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe His Tyr**  
 1 5 10

20 <210> 122  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 122  
**Ser Tyr Ala Ile Ser**  
 1 5

30 <210> 123  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 123  
**Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**  
 1 5 10 15

35 **Gly**

<210> 124  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 124  
**Gly His Lys Tyr Gly Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr**  
 1 5 10

45 <210> 125  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 125  
**Ser Tyr Ala Ile Ser**  
 1 5

<210> 126  
 <211> 17  
 <212> PRT

ES 2 550 639 T3

<213> Homo sapiens

<400> 126

**Glu Ile Ile Pro Ile Phe Gly Ile Val Asn Tyr Ala Gln Lys Phe Gln**  
**1 5 10 15**

**Gly**

5

<210> 127

<211> 10

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 127

**Glu Thr Ala Val Ala Gly Ile Leu Gly Tyr**  
**1 5 10**

<210> 128

15

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 128

20

**Ser His Asn Met Asn**  
**1 5**

<210> 129

<211> 17

<212> PRT

25

<213> Homo sapiens

<400> 129

**Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys**  
**1 5 10 15**

**Gly**

30

<210> 130

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

35

<400> 130

**Glu Asp Trp Gly Tyr Phe Asp**  
**1 5**

<210> 131

40

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 131

**Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**

45

<210> 132

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

50

<400> 132

**Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser**  
**1 5**

<210> 133

<211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5 <400> 133  
**Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr**  
**1 5**  
 <210> 134  
 <211> 11  
 10 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 134  
**Arg Met Ser Gln Gly Ile Arg Ser Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**  
 15 <210> 135  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 20 <400> 135  
**Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser**  
**1 5**  
 25 <210> 136  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 136  
**Gln Gln Tyr Tyr Ser Phe Pro Tyr Thr**  
 30 **1 5**  
 <210> 137  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 35 <213> Homo sapiens  
 <400> 137  
**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala**  
**1 5 10**  
 40 <210> 138  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 45 <400> 138  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**  
 <210> 139  
 <211> 9  
 50 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 139  
**Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr**  
 55 **1 5**  
 <210> 140  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 140  
**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala**  
**1 5 10**

5 <210> 141  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10 <400> 141  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**

<210> 142  
 <211> 9  
 15 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 142  
**Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr**  
**1 5**

20 <210> 143  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

25 <400> 143  
**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 144  
 <211> 7  
 30 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 144  
**Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser**  
**1 5**

<210> 145  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 40 <213> Homo sapiens

<400> 145  
**Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr**  
**1 5**

45 <210> 146  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

50 <400> 146  
**Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Asp Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 147  
 <211> 7  
 55 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 147  
**Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser**  
**1 5**

ES 2 550 639 T3

<210> 148  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 5 <213> Homo sapiens  
  
 <400> 148  
**Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Phe Thr**  
**1 5**

10 <210> 149  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw21

20 <400> 149  
 cgtggaacc gcagtgaaca atagctatt 29

25 <210> 150  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> cebador CD123-Re21

35 <400> 150  
 actctgttct tttaacaca ctcgatatcg 30

40 <210> 151  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

45 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw22

50 <400> 151  
 cttatccaa ataacagtgg gaagccttg 29

55 <210> 152  
 <211> 31  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

60 <220>  
 <223> cebador CD123-Re22

65 <400> 152  
 cagtttctgt tggatggtg ggtggccac t 31

70 <210> 153  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

75 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw23

80 <400> 153  
 agggagggta ccggtgcgga gaatctgacc tgct 34

85 <210> 154

ES 2 550 639 T3

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5 <220>  
 <223> cebador CD123-Re23  
 <400> 154  
 tcctgaattt g gatagaaga ggatccacgt gg 32  
 10 <210> 155  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw24  
 <400> 155  
 20 ggtccgacgg cccccgcgga cgtccagta 29  
 <210> 156  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador CD123-Re24  
 30 <400> 156  
 cctcgcccag gtacagctca agaaatccac gt 32  
 <210> 157  
 <211> 30  
 35 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw25  
 40 <400> 157  
 acggaaccag cgcagccttc ggtatcccct 30  
 <210> 158  
 <211> 28  
 45 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 <220>  
 50 <223> cebador CD123-Re25  
 <400> 158  
 taaccagaaa gtgggaactt tgagaacc 28  
 55 <210> 159  
 <211> 28  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 60 <220>  
 <223> cebador CD123-Fw26  
 <400> 159  
 tctttgattc attgtcgtc ttttcaca 28  
 65 <210> 160

ES 2 550 639 T3

<211> 29  
<212> ADN  
<213> Artificial

5 <220>  
<223> cebador CD123-Re26

<400> 160  
attggatgcc gaaggctgcg ctctgccc

29

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo contra una cadena de IL-3R $\alpha$  humana, que no inhibe la señalización de IL-3, y que se une al dominio B de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana pero no se une al dominio C de la cadena de IL-3R $\alpha$  humana.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que presenta además una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) elevada.
- 10 3. Anticuerpo según la reivindicación 1 o 2, en el que la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) elevada muestra un porcentaje de lisis específica de 10% a una concentración de anticuerpo de 0,01  $\mu$ g/ml, mediante un método de ensayo de ADCC de Colon-26/hCD123 que utiliza PBMC cultivadas con IL-2.
- 15 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende unas secuencias de aminoácidos de CDR de cadena pesada y CDR de cadena ligera seleccionadas de entre el grupo que consiste en los (a) a (e) siguientes:
- (a) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 113 a 115, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 131 a 133, respectivamente,
- 20 (b) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 116 a 118, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 134 a 136, respectivamente,
- 25 (c) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 119 a 121, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 137 a 139, respectivamente,
- 30 (d) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 122 a 124, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 140 a 142, respectivamente, y
- 35 (e) CDR 1 a 3 de la cadena pesada son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 125 a 127, respectivamente, y CDR 1 a 3 de la cadena ligera son las secuencias de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 143 a 145, respectivamente.
5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionadas de entre el grupo que consiste en los (a) a (e) siguientes:
- 40 (a) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 53 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de valina (V) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 55;
- 45 (b) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 57 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de valina (V) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 59;
- 50 (c) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 61 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 63;
- 55 (d) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 139 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 65, y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 67; y
- 60 (e) una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de glutamina (Q) en la posición 20 a serina (S) en la posición 138 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 69 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de ácido aspártico (D) en la posición 23 a lisina (K) en la posición 129 en la secuencia de aminoácidos de SEC ID n $^{\circ}$ : 71.
- 65 6. Composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de IL-3R $\alpha$  según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización en un método para prevenir o tratar un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-

3R $\alpha$  se encuentra en la médula ósea o la sangre periférica de un sujeto.

5 7. Anticuerpo de IL-3R $\alpha$  según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para su utilización en un método para tratar un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-3R $\alpha$  se encuentra en la médula ósea o la sangre periférica.

10 8. Utilización del anticuerpo de IL-3R $\alpha$  según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, para detectar en una muestra biológica de un sujeto un tumor de la sangre en el que una célula que expresa IL-3R $\alpha$  se encuentra en la médula ósea o la sangre periférica.

9. Composición farmacéutica para su utilización según la reivindicación 6, anticuerpo de IL-3R $\alpha$  para su utilización según la reivindicación 7, o utilización del anticuerpo de IL-3R $\alpha$  según la reivindicación 8, en la/el que el tumor de la sangre es la leucemia mieloide aguda (AML).

Fig. 1

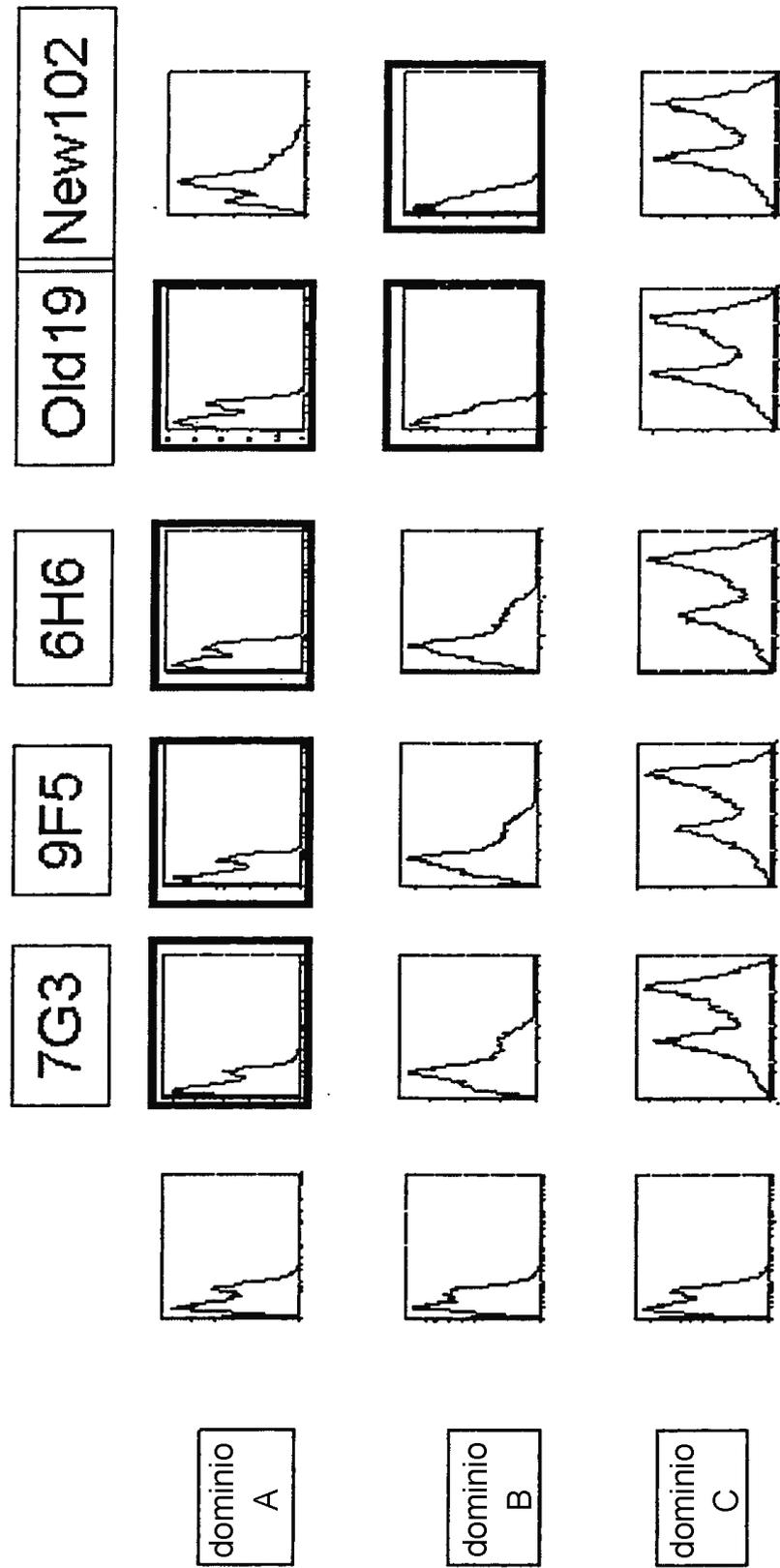


Fig. 2

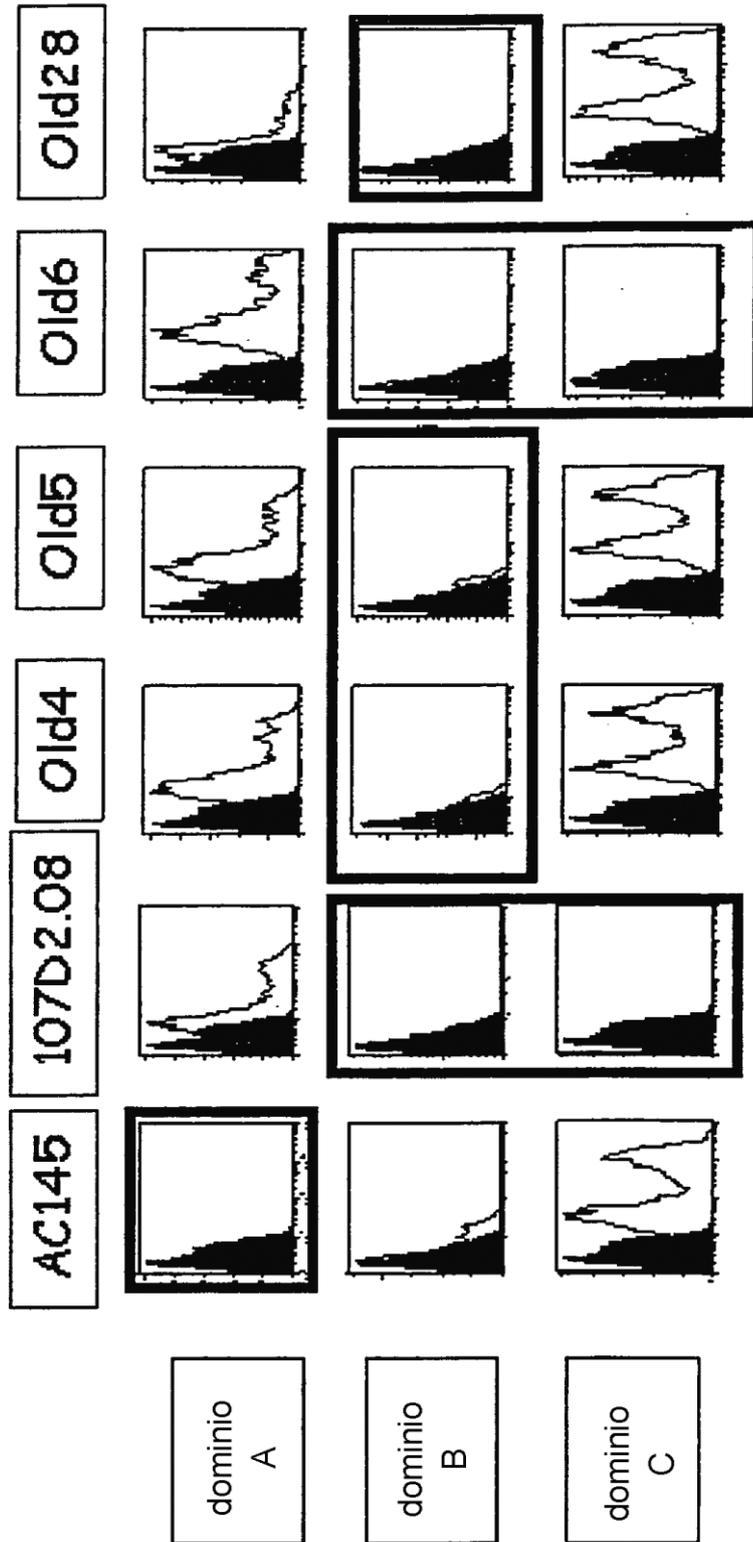


Fig. 3

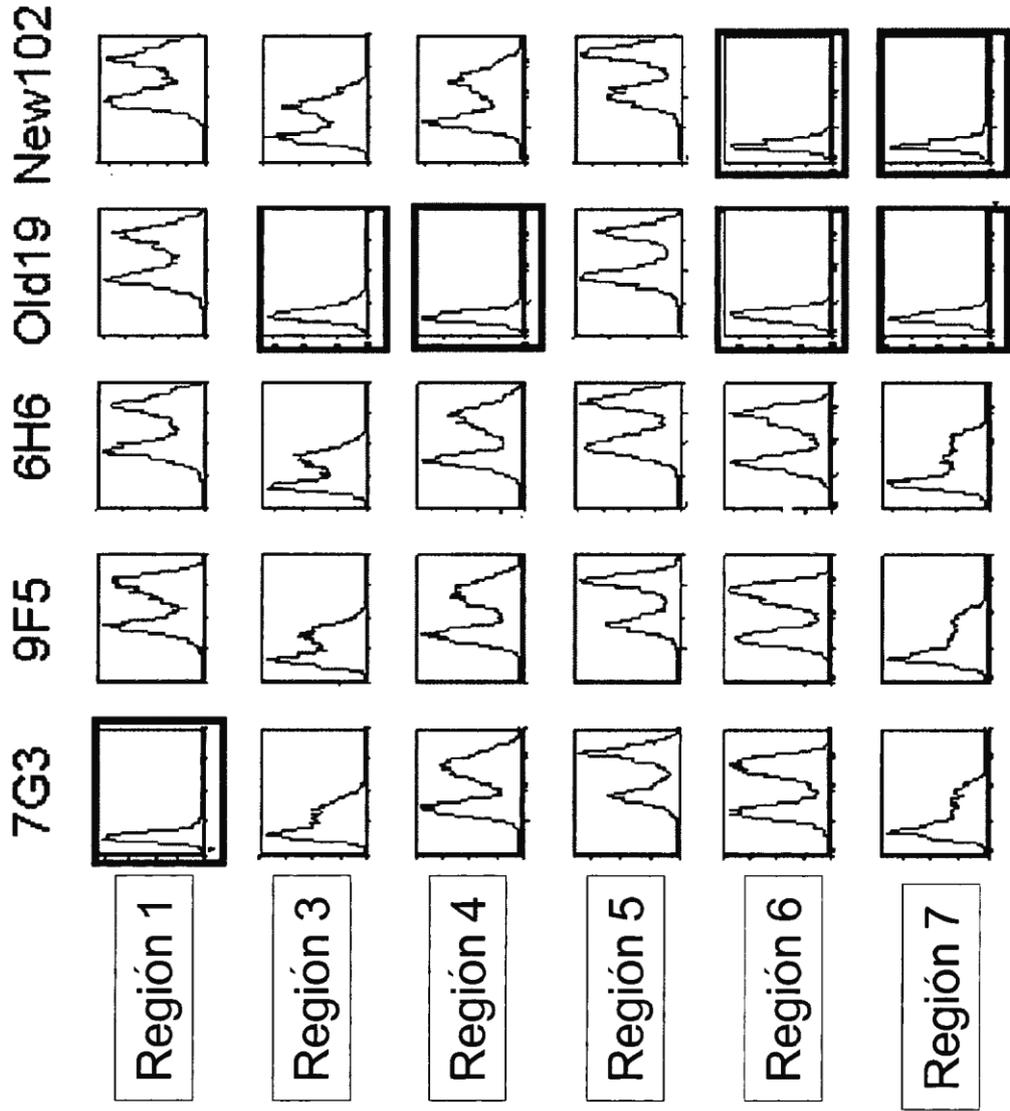


Fig. 4

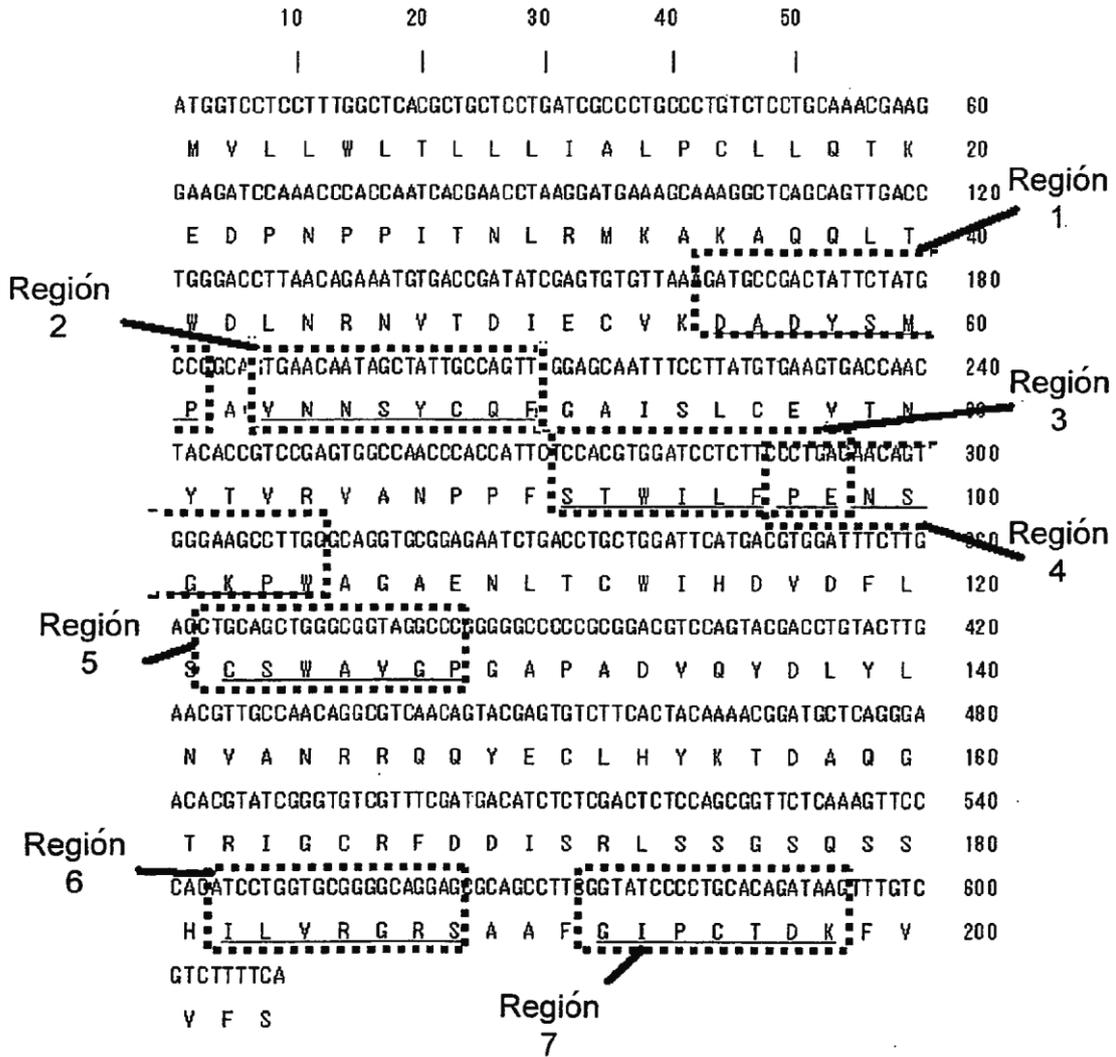


Fig. 5

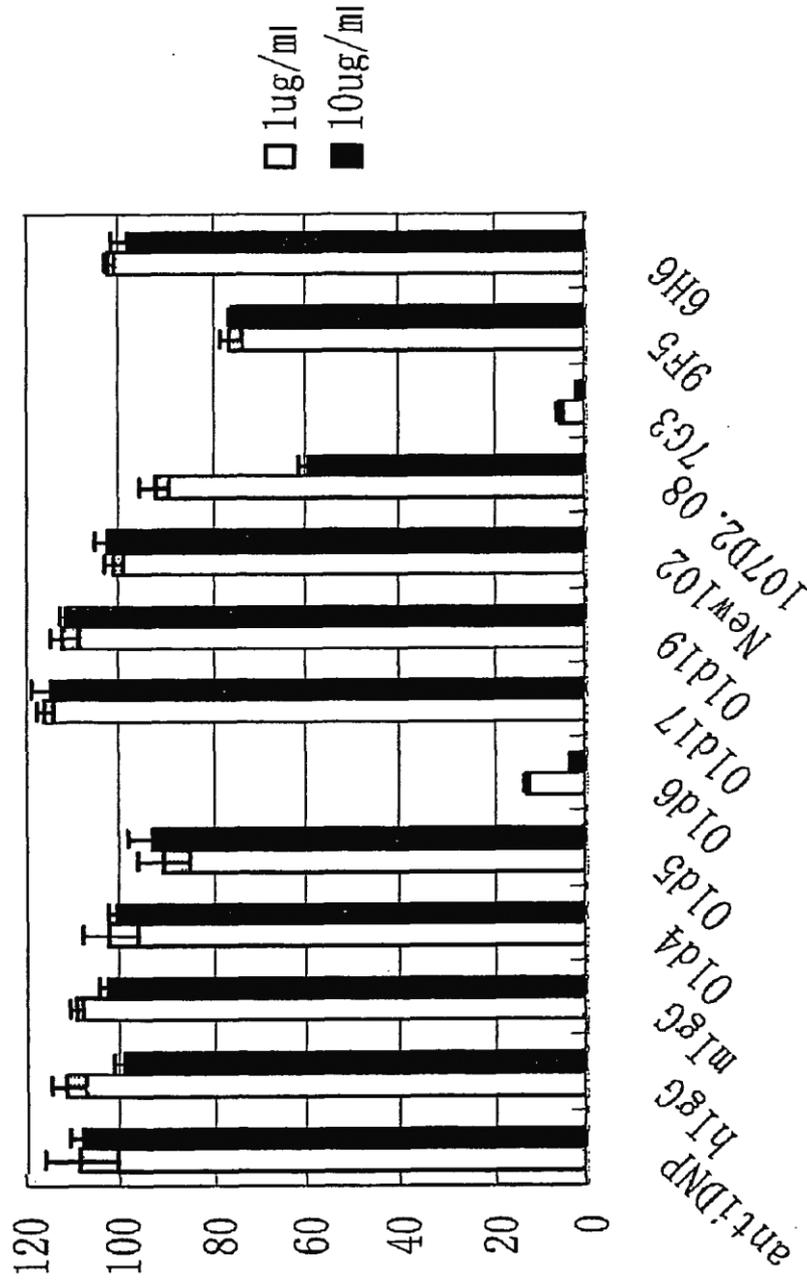


Fig. 6

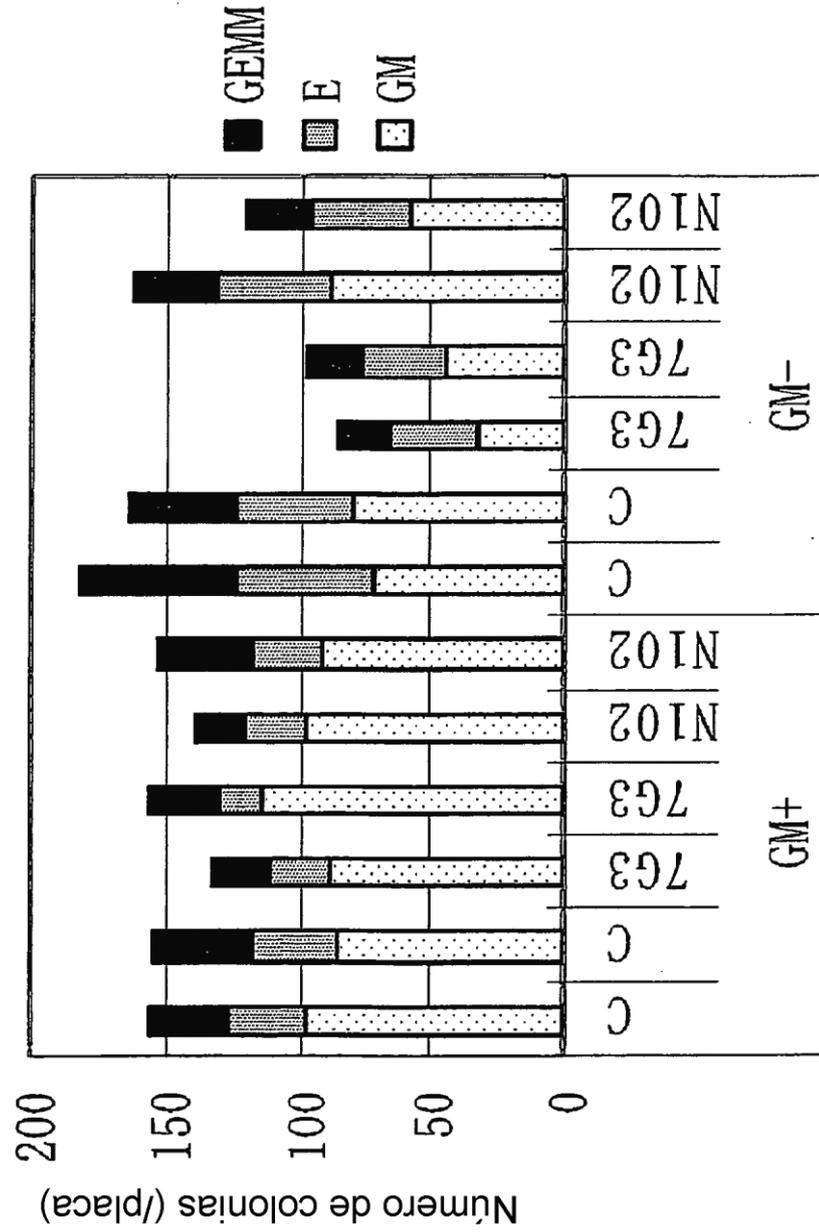


Fig. 7

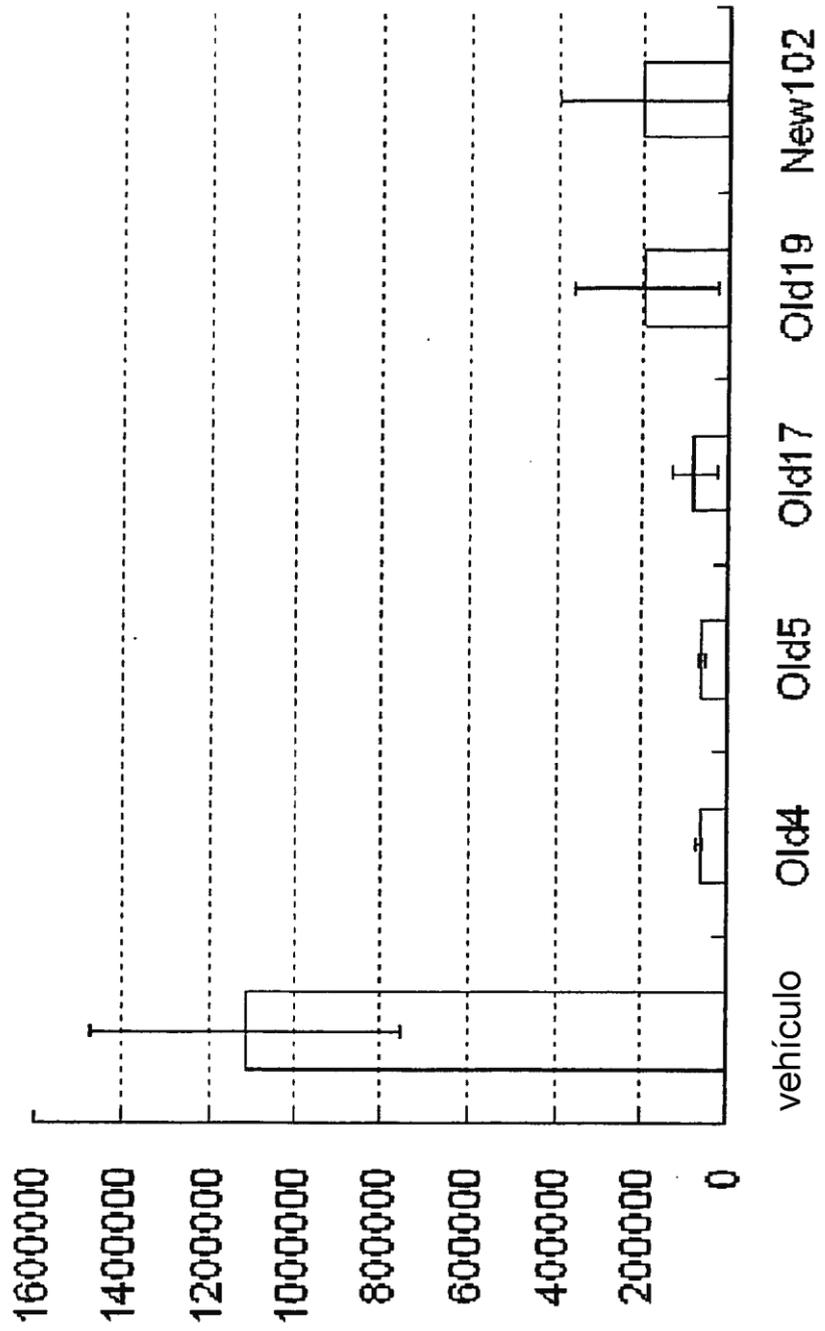


Fig. 8

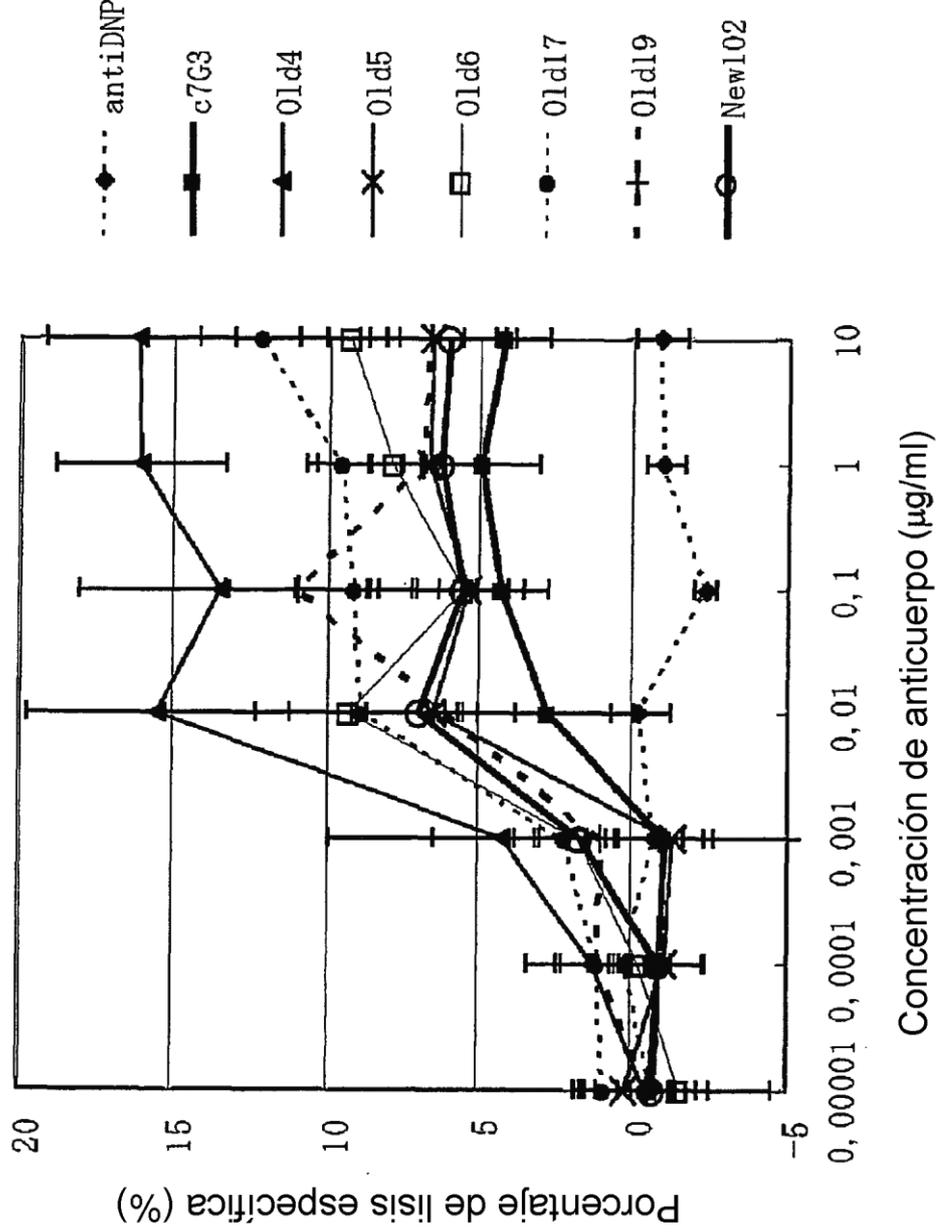


Fig. 9

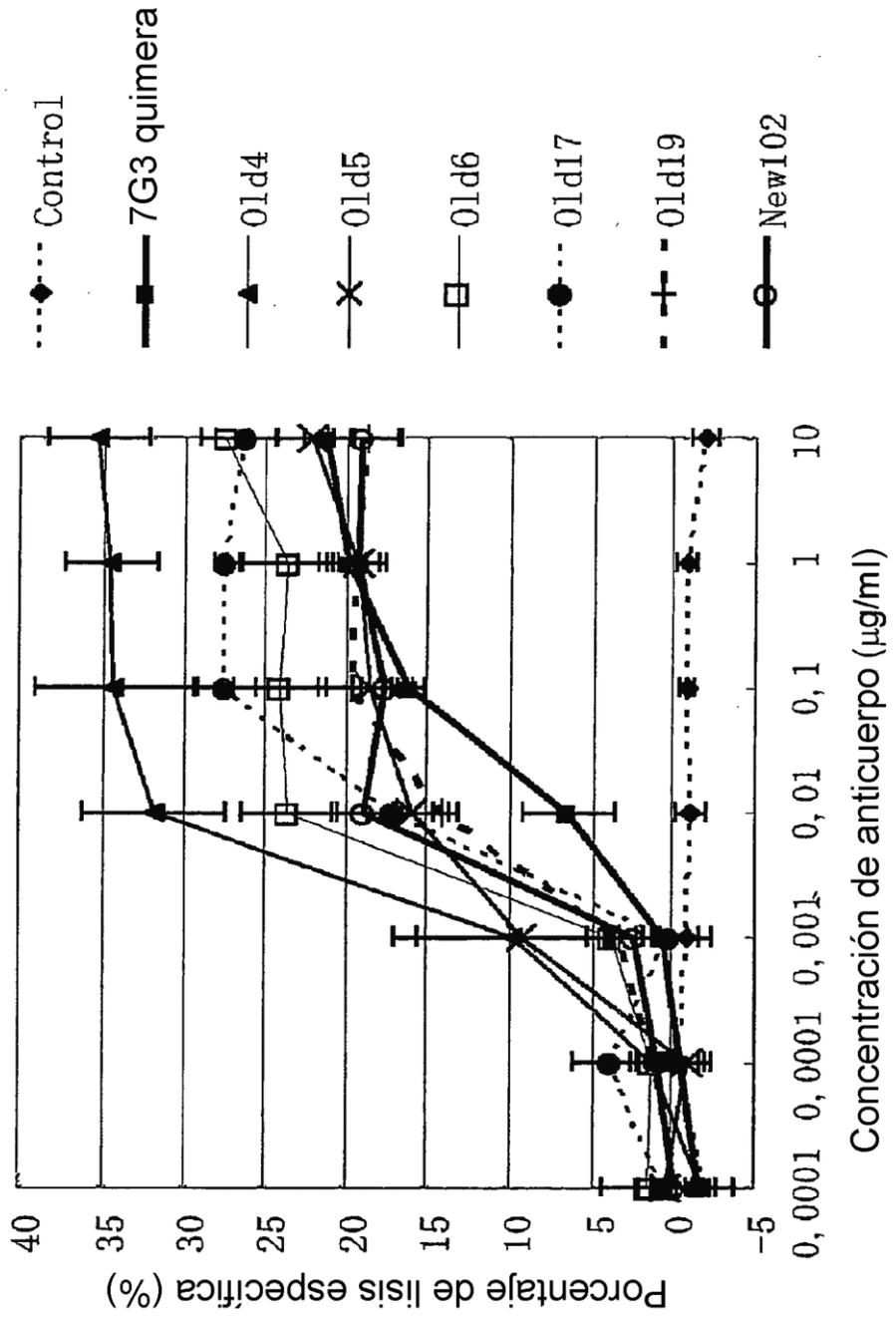


Fig. 10

