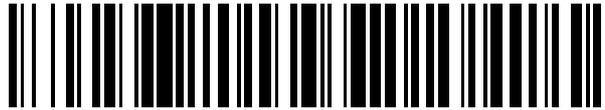


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 555 979**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C12N 5/12** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 51/10** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2006 E 10011775 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.10.2015 EP 2311878**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**24.11.2005 EP 05025657**

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

**12.01.2016**

73 Titular/es:

**GANYMED PHARMACEUTICALS AG (50.0%)**  
**An der Goldgrube 12**  
**55131 Mainz, DE y**  
**JOHANNES GUTENBERG-UNIVERSITÄT MAINZ,**  
**VERTRETEN DURCH DEN PRÄSIDENTEN (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SAHIN, UGUR;**  
**TÜRECI, ÖZLEM;**  
**USENER, DIRK;**  
**FRITZ, STEFAN;**  
**UHEREK, CHRISTOPH;**  
**BRANDENBURG, GUNDA;**  
**GEPPERT, HARALD-GERHARD;**  
**SCHRÖDER, ANJA KRISTINA y**  
**THIEL, PHILIPPE**

74 Agente/Representante:

**CURELL AGUILÁ, Mireia**

**ES 2 555 979 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento del cáncer.

5 Las terapias basadas en anticuerpos para el cáncer presentan el potencial de una mayor especificidad y un perfil de efectos secundarios más bajo que los fármacos convencionales. El motivo es la diferenciación precisa entre células normales y neoplásicas realizada por los anticuerpos y que su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, tales como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunológicas citotóxicas.

10 Las dianas para las terapias basadas en anticuerpos deben presentar cualidades particulares, que forman la base para una discriminación correcta entre células normales y neoplásicas. Evidentemente una diana con restricción exclusiva a las células tumorales y totalmente indetectable en los tejidos normales resulta ideal para el desarrollo de terapéuticas de anticuerpos eficientes y seguras. En otro aspecto, un nivel elevado de sobreexpresión puede ser la base para la ventana terapéutica y los bajos efectos secundarios ejemplificados por el receptor de tipo 2 del factor de crecimiento epidérmico (HER-2), que como resultado de la amplificación génica es una buena diana para el anticuerpo trastuzumab (Herceptin).

20 Otras dianas para anticuerpos que ya han sido aprobados o que se encuentran en desarrollo clínico para la terapia tumoral presentan claras cualidades que no se basan en una sobreexpresión numérica de las moléculas diana sobre las células tumorales. En el caso de los anticuerpos contra el proteoglicano MUC-1, un péptido epítipo repetitivo en el esqueleto de la diana se encuentra infraglicosilado en las células tumorales y, de esta manera, alterado respecto a su contrapartida normal. En el caso de los anticuerpos contra CD20 (rituximab), CD52 (Campath-1H) y CD22 (epratuzumab), las dianas de anticuerpo presentan niveles de expresión comparables sobre las células tumorales y los linfocitos normales. En este caso, la ablación de células normales por el anticuerpo resulta tolerable, ya que las células madre no diana restituye el repertorio de linfocitos normal. Otros ejemplos de diferente accesibilidad de dianas para el anticuerpo son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la carboanhidrasa IX (CA9). Ambos antígenos se expresan sobre epitelios normales de colon y riñón, respectivamente. Sin embargo, los anticuerpos marcados radioactivamente para la obtención de imágenes sí distinguen bien entre tumor y tejido normal, y los anticuerpos citotóxicos resultan bien tolerados. Esto con toda probabilidad se debe a una expresión restringida de CA9 y CEA sobre la cara luminal del tejido epitelial normal, a la que no pueden acceder los anticuerpos IgG. Además, la molécula antigénica de adhesión a células epiteliales (Ep-CAM) pertenece a esta categoría. Debido a que es una molécula de adhesión a células homotípicas para las células epiteliales se localiza en el espacio intercelular. Curiosamente, mientras que los anticuerpos anti-Ep-CAM de alta afinidad son muy tóxicos, los anticuerpos de afinidad intermedia resultan bien tolerados. Esto sugiere accesibilidad de la diana Ep-CAM sobre las células normales, aunque también indica que la cinética de unión de los anticuerpos podría abrir una ventana terapéutica.

40 Una posibilidad es que otras proteínas específicas de las células epiteliales que participan en la adhesión célula/célula también resulten atractivas para los enfoques basados en anticuerpos, ya que en epitelios bien estructurados podrían resultar escasamente accesibles a los anticuerpos pero pasar a estar expuestos sobre las células tumorales. Por lo tanto, los presentes solicitantes analizaron proteínas que participan en la organización de la estructura del tejido epitelial para su idoneidad como dianas para anticuerpos terapéuticos. Una proteína que atrajo particularmente su atención fue la claudina-18.

45 La molécula de la claudina-18 (CLD18) (número de acceso de Genbank: variante de corte y empalme 1 (CLD18A1): NP\_057453, NM\_016369 y la variante de corte y empalme 2 (CLD18A2): NM\_001002026, NP\_001002026) es una proteína transmembranal integral con un peso molecular de aproximadamente 27,9/27,72 kD. Las claudinas son proteínas de membrana integrales situadas dentro de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Las uniones estrechas organizan una red de filamentos interconectados de partículas intramembranas entre células contiguas. En las uniones estrechas, la ocludina y las claudinas son los componentes de proteína transmembranal más importantes. Debido a sus fuertes propiedades de adhesión intercelular, crean una barrera primaria para impedir y controlar el transporte paracelular de solutos y restringir la difusión lateral de los lípidos y proteínas membranales, manteniendo la polaridad celular. Las proteínas formadoras de unión estrecha son participantes cruciales en la organización de la estructura del tejido epitelial. Se planteó que dichas proteínas podrían ser escasamente accesibles a los anticuerpos en epitelios bien estructurados pero pasar a encontrarse expuestas sobre las células tumorales. El documento WO2004/047863 describe la identificación de las variantes de corte y empalme CLD18A1 y CLD18A2 como dianas del cáncer terapéuticas y diagnósticas.

60 La CLD18 es una tetraspanina y presenta, de esta manera, 4 regiones hidrófobas. Los presentes solicitantes obtuvieron resultados que indicaban que CLD18 muestra varias conformaciones diferentes que podrían ser dianas selectivas de los anticuerpos. Una conformación (CLD18-Conformación-1) implica que la totalidad de las cuatro regiones hidrófobas actúa de dominios transmembranales (DT) normales y que se forman dos bucles extracelulares (el bucle1, abrazado por la región hidrófoba 1, y la región hidrófoba 2 y el bucle2, abrazados por las regiones hidrófobas 3 y 4), tal como se describe para la amplia mayoría de miembros de la familia de las claudinas. Una segunda conformación (CLD18-Conformación-2) implica que, tal como se ha descrito para PMP22, otro miembro de la familia de las tetraspaninas (Taylor *et al.*, J. Neurosc. Res. 62:15-27, 2000), el segundo y tercer dominios

hidrófobos no cruzan por completo la membrana plasmática de manera que la porción (bucleD3) entre el primer y cuarto dominios transmembranales es extracelular. Una tercera conformación (CLD18-Conformación-3) implica un dominio extracelular de gran tamaño con dos regiones hidrófobas internas abrazadas por la primera y cuarta regiones hidrófobas, que sirven de dominios transmembranales normales. Debido a la presencia del sitio clásico de N-glicosilación en el bucleD3, las variantes topológicas de la claudina-18, CLD18-topología-2 y CLD18-topología-3 alojan un sitio de N-glicosilación extracelular adicional.

Se añade otro nivel de complejidad a la molécula de CLD18 por la presencia de dos variantes de procesamiento diferentes, las cuales han sido descritas en el ratón y el ser humano (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). Las variantes de procesamiento CLD18A1 y CLD18A2 difieren en los primeros 21 aminoácidos N-terminales, que comprenden el primer TM y el bucle1, mientras que la secuencia proteica primaria del extremo C-terminal es idéntica.

CLD18A1 se expresa selectivamente sobre los epitelios pulmonar y estomacal normales, mientras que CLD18A2 se expresa únicamente sobre las células gástricas (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21:7380-90, 2001). Más importante, CLD18A2 se restringe a células diferenciadas efímeras del epitelio estomacal pero no se encuentra presente en la región de células madre gástricas. Mediante la utilización de RT-PCR sensible, se ha demostrado que ambas variantes no son detectables en absoluto en ningún otro órgano humano normal, pero se expresan robustamente en varios tipos de cáncer, entre ellos los tumores de estómago, esofágico, pancreático y pulmonar, así como en líneas celulares de cáncer humanas. La expresión es más importante en los subtipos de adenocarcinoma de estas indicaciones.

En algunos cánceres el peso molecular de la proteína difiere en el cáncer y el tejido normal contiguo. La proteína de peso molecular más alto observada en el tejido sano puede pasar a presentar el mismo peso molecular observado en el cáncer tras el tratamiento de lisados del tejido con el compuesto desglucosilante PNGasa F. Esto sugiere que CLD18 se encuentra menos N-glicosilado en el cáncer que en su contrapartida de tejido normal. Esta diferencia estructural probablemente da lugar a un epítipo alterado. Un motivo clásico de N-glicosilación se encuentra en la posición aa 116 dentro del dominio bucleD3 de la molécula.

Los términos "CLD18" y "variante de CLD18" según la invención comprenden: (i) variantes de procesamiento de CLD18, (ii) variantes de N-glicosilación de CLD18, (iii) variantes de conformación de CLD18, (iv) variantes de CLD18 libre y homotípica/heterotípicamente asociadas y localizadas en uniones estrechas intercelulares, y (v) variantes relacionadas con células de cáncer CLD18 y con células no de cáncer CLD18.

Las características moleculares y funcionales de CLD18 convierten a esta molécula en una diana muy interesante para la terapia del cáncer basada en anticuerpos. Éstas en particular son: (i) la ausencia de CLD18 de la amplia mayoría de tejidos normales de toxicidad relevante, (ii) la restricción de la expresión de variante CLD18A2 a una población celular dispensable tal como células gástricas diferenciadas, que pueden ser restituidas por células madre sin diana del estómago, (iii) sugiere a la potencial glucosilación diferencial en células normales y neoplásicas, y (iv) la presencia de diferentes topologías conformacionales. Además, el papel de CLD18 como proteína de unión estrecha podría contribuir además a una buena ventana terapéutica. Debido a que las células tumorales expresan claudinas, aunque con frecuencia no forman uniones estrechas clásicas mediante asociación homotípica y heterotípica de las claudinas tal como se encuentran en el tejido epitelial normal, las células tumorales podrían presentar un pool considerable de claudinas libres que es susceptible a la unión extracelular de anticuerpos y a la inmunoterapia. Posiblemente los epítipos de unión de las claudinas en el epitelio sano se encuentran resguardados dentro de uniones estrechas protegidos del acceso de dichos anticuerpos.

El objetivo de la invención es proporcionar anticuerpos que resultan útiles para la terapia de enfermedades en la que se expresa CLD18, tal como las enfermedades tumorales. Los anticuerpos indicados en la presente memoria también presentan utilidad en el diagnóstico de dichas enfermedades.

### Sumario de la invención

La presente invención proporciona de manera general anticuerpos que resultan útiles como terapéuticos para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades asociadas a células que expresan CLD18, incluyendo enfermedades relacionadas con tumores, tales como el cáncer gástrico, el cáncer esofágico, el cáncer pancreático, el cáncer pulmonar, el cáncer ovárico, el cáncer de colon, el cáncer hepático, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer de la vesícula biliar.

En un aspecto, la invención se refiere a un anticuerpo que comprende una combinación de cadenas pesadas y cadenas ligeras seleccionada de entre las posibilidades (i) a (ix) siguientes:

- (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 115 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 122,
- (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 116 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 121,

- (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 117 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 123,
- 5 (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 119 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 126,
- (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 118 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 125,
- 10 (vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 124,
- (vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 127,
- 15 (viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 128, y
- 20 (ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 129.

25 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que presenta la capacidad de unirse a CLD18 y de mediar en la destrucción de las células que expresan CLD18. Preferentemente, el anticuerpo se une a CLD18A1 y CLD18A2 y más preferentemente se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1. Los anticuerpos de la invención se unen a y son específicos para el bucle 1 de la CLD-conformación-1 o el bucle D3 de la CLD-conformación-2.

30 La destrucción de las células del anticuerpo de la invención es inducida preferentemente uniendo el anticuerpo a la CLD18 expresada por dichas células, más preferentemente uniendo el anticuerpo a la CLD18A2 expresada por dichas células. En una forma de realización, la unión del anticuerpo de la invención a CLD18A1 expresada por dichas células no induce la destrucción de dichas células.

35 Las células que expresan CLD18 preferentemente son células de cáncer y se seleccionan, en particular, de entre el grupo que consiste de células tumorógenas gástricas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

40 Preferentemente el anticuerpo de la invención media en la destrucción de las células induciendo una lisis mediada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) y/o una lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC).

En una forma de realización el anticuerpo de la invención no induce la lisis mediada por CDC de las células.

45 La lisis mediada por la ADCC de las células puede tener lugar en presencia de células efectoras, que pueden ser seleccionadas de entre el grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN.

50 El anticuerpo de la divulgación puede ser un anticuerpo quimérico, humano o humanizado, y puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en anticuerpos IgG1, IgG2, preferentemente IgG2a e IgG2b, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgA secretorio, IgD e IgE.

Según todos los aspectos de la invención, CLD18 preferentemente es CLD18 humano, preferentemente CLD18A2 humano, y CLD18A2 preferentemente presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID nº 2 y CLD18A1 preferentemente presenta la secuencia de aminoácidos según SEC ID nº 8.

55 En las formas de realización preferidas particulares, el anticuerpo de la invención se une a epítopos nativos de CLD18A2 presentes sobre la superficie de las células vivas. En formas de realización preferidas adicionales, el anticuerpo de la invención es específico para las células de cáncer, preferentemente las células de cáncer de estómago.

60 En determinadas formas de realización de la invención, CLD18A2 se expresa sobre la superficie de las células.

65 Los anticuerpos de la invención pueden obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que presenta una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 2, nº 4, nº 6, nº 16, nº 20, nº 21 a nº 23, y nº 26 a nº 31, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico o células huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico del

mismo. Preferentemente, un anticuerpo de la invención es específico para las proteínas y péptidos anteriormente indicados o fragmentos inmunogénicos de los mismos.

5 El anticuerpo de la invención puede ser producido, por ejemplo, por un clon que presenta el nº de acceso DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294) o DSM ACC2810 (182-D1106-362).

La presente invención se refiere asimismo a un hibridoma que puede producir el anticuerpo de la presente invención.

10 El anticuerpo de la invención puede estar acoplado a un agente terapéutico, tal como una toxina, un isótopo radioactivo, un fármaco o un agente citotóxico.

15 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un conjugado que comprende el anticuerpo de la presente invención acoplado a un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es preferentemente una toxina, un isótopo radioactivo, un fármaco o un agente citotóxico.

Los anticuerpos de la invención se denominan en la presente memoria haciendo referencia a la denominación del anticuerpo, por ejemplo 182-D758-035 y/o haciendo referencia al clon producto del anticuerpo, por ejemplo 26D12.

20 La invención se refiere además a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y/o un conjugado de la invención, y un portador farmacéuticamente aceptable.

25 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo de la presente invención para su utilización en un procedimiento de inhibición del crecimiento y/o de destrucción de una célula que expresa CLD18A2. Dicho procedimiento puede, por ejemplo, comprender poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención y/o un conjugado del mismo con un agente terapéutico. La CLD18 es expresada preferentemente sobre la superficie de dicha célula.

30 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un anticuerpo o conjugado o una composición farmacéutica de la presente invención para su utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que implica a las células que expresan CLD18A2. Preferentemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores y en las formas de realización particulares es seleccionada/o de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de la vesícula biliar y sus metástasis. La CLD18 es expresada preferentemente sobre la superficie de dichas células.

35 Preferentemente, los anticuerpos de la invención pueden presentar la capacidad de discriminar las variantes de CLD18 expresadas por los diferentes tipos de células que incluyen las células cancerosas y las células no malignas. En una forma de realización particularmente preferida, los anticuerpos de la invención presentan la capacidad de unirse a CLD18A2 mientras que no se unen a la CLD18A1, o se unen a CLD18A1 con una especificidad inferior en comparación con la especificidad de unión a la CLD18A2.

40 El término "unión" según la invención preferentemente se refiere a una unión específica. La expresión "unión específica" se refiere a que un agente, tal como un anticuerpo, se une de manera más fuerte a una diana, tal como epítipo para el que es específico, que a otra diana. Un agente se une de manera más fuerte a una primera diana que a una segunda diana en el caso de que se une a la primera diana con una constante de disociación ( $K_D$ ) que sea inferior a la constante de disociación para la segunda diana. Preferentemente, la constante de disociación ( $K_D$ ) para la diana a la que se une específicamente el agente es más de 10 veces, preferentemente más de 20 veces, más preferentemente más de 50 veces, todavía más preferentemente más de 100 veces, 200 veces, 500 veces ó 1.000 veces más baja que la constante de disociación ( $K_D$ ) para la diana a la que no se une el agente específicamente.

45 Los anticuerpos de la invención median en la eliminación de las células que expresan CLD18, preferentemente CLD18A2, mediante la unión a CLD18 preferentemente expresado sobre la superficie de dichas células. En una forma de realización, los anticuerpos de la invención inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo lisis mediada por CDC de por lo menos aproximadamente 20% a 40%, preferentemente la lisis mediada por CDC de aproximadamente 40% a 50%, y más preferentemente lisis mediada por CDC superior a 50% de células que expresan CLD18. Dichos anticuerpos se ejemplifican en la presente memoria con los anticuerpos siguientes: 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 163E12, 175D10, 45C1, 125E1, ch-16E12 y ch-175D10.

60 Alternativamente, o además de inducir CDC, los anticuerpos de la invención pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CLD18 en presencia de células efectoras (por ejemplo monocitos, células mononucleares, células NK y PMN). Dichos anticuerpos se ejemplifican en la presente memoria mediante los anticuerpos siguientes: 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 42E12, 163E12, 175D10, 45C1 y 125E1. Los anticuerpos de la invención pueden presentar la capacidad de inducir apoptosis de las células que expresan CLD18, inducir la adhesión homotípica de células que expresan CLD18 y/o inducir fagocitosis de células que expresan CLD18 en presencia de macrófagos. Los anticuerpos de la invención

pueden presentar una o más de las propiedades funcionales descritas anteriormente. Preferentemente, los anticuerpos de la invención inducen lisis mediada por CDC y lisis mediada por ADCC de células que expresan CLD18 y más preferentemente inducen lisis mediada por ADCC de células que expresan CLD18, mientras que no inducen la lisis mediada por CDC de dichas células. Entre las células diana ejemplificativas para los anticuerpos de la presente invención se incluyen, aunque sin limitarse a ellas, las células de cáncer que expresan CLD18, preferentemente CLD18A2, tales como las células tumorógenas gástricas, pancreáticas, esofágicas y pulmonares. En una forma de realización preferente particular, la eliminación de las células mediada por anticuerpos de la invención es específica de CLD18A2, es decir, los anticuerpos de la invención median en la eliminación de las células, preferentemente la lisis mediada por CDC y/o ADCC de las células, que expresan CLD18A2 pero no media en la eliminación de células que expresan CLD18A1 pero que no expresan CLD18A2. Los anticuerpos indicados anteriormente pueden utilizarse para mediar en la eliminación de las células tumorales en el tratamiento o la prevención del cáncer, tal como el cáncer gástrico, el cáncer esofágico, el cáncer pancreático, el cáncer pulmonar, el cáncer ovárico, el cáncer de colon, el cáncer hepático, el cáncer de cabeza y cuello y el cáncer de vesícula biliar.

Los anticuerpos de la invención pueden categorizarse en clases diferentes según sus propiedades de unión y su capacidad para mediar en la función efectora sobre las células que expresan CLD18. Los anticuerpos de la invención pueden categorizarse según sus:

- propiedades de unión y/o las funciones efectoras mediadas sobre células que expresan CLD18A1 ó CLD18A2 (discriminación entre variantes de procesamiento de CLD18),
- propiedades de unión y/o las funciones efectoras mediadas sobre células que expresan variantes de CLD18 glucosiladas o no glucosiladas (discriminación entre variantes de CLD18 con y sin N-glucosilación),
- propiedades de unión y/o las funciones efectoras mediadas sobre células de cáncer o tipos celulares normales (discriminación entre variantes de CLD18 expresadas por células tumorales o por células no malignas normales),
- propiedades de unión a epítomos CLD18 enmascarados por la formación de uniones estrechas,
- capacidad de inducir la formación de agregados de CLD18 sobre las células vivas, y
- capacidad de unirse a una variante de CLD18 no humana, particularmente a variantes de CLD18 de ratones, ratas, conejos y primates.

Los anticuerpos de la invención pueden presentar una o más de las propiedades siguientes, en los que se hace referencia a ejemplos específicos de anticuerpos de la invención indicados en la presente memoria (24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10, ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, ch-175D10):

- a) unión a CLD18A2, así como a CLD18A1 (por ejemplo 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 61C2 y 41C6),
- b) unión a CLD18A2 pero no a CLD18A1 (por ejemplo 26B5, 37G11, 38G5, 42E12 y 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10, ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, ch-175D10),
- c) unión a CLD18 expresado naturalmente por células tumorales pero no a CLD18 expresado naturalmente por células o tejidos no de cáncer, tales como células de estómago y de pulmón (por ejemplo 26B5, 75B8, 24H5, 39F11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10).
- d) mediación en la eliminación inducida por CDC de las células, que expresan CLD18A2 pero no de células que expresan CLD18A1 (por ejemplo 26D12, 28D10, 37H8 y 39F11, 163E12, ch-125E1, ch-163E12, ch-175D10),
- e) mediación en la eliminación inducida por ADCC de células que expresan CLD18 (por ejemplo 26B5, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 47D12 y 61C2, ch-163E12, ch-175D10),
- f) mediación en la eliminación inducida por ADCC pero no en la eliminación mediada por CDC de células que expresan CLD18 (por ejemplo 37G11, 42E12 y 43A11),
- g) mediación en la eliminación inducida por ADCC y en la eliminación inducida por CDC de células que expresan CLD18A2 (por ejemplo 37H8, 38H3, 39F11, ch-163E12, ch-175D10).

Tal como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos de la invención comprenden además moléculas que:

- a) se unen a células diferenciadas del estómago normal, pero no a células madre del estómago (por ejemplo 39F11),
- b) no se unen a tejido gástrico normal, así como a otros órganos normales, sino exclusivamente a células de cáncer (por ejemplo 26B5),
- c) se unen a un epítipo que comprende un Asn no glucosilado en la posición 116 de CLD18,
- d) se unen a CLD18 humano, así como de ratón, permitiendo llevar a cabo estudios preclínicos de toxicidad en ratones.

Los anticuerpos de la invención pueden derivarse de diferentes especies, incluyendo, aunque sin limitación, el ratón, la rata, el conejo, el cobaya y el ser humano. Entre los anticuerpos de la invención también se incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferentemente el ser humano, se combina con el sitio de unión a antígeno de otra especie. Además, entre los anticuerpos de la invención se incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con regiones constantes y de marco de origen humano.

Entre los anticuerpos de la invención se incluyen los anticuerpos policlonales y monoclonales y se incluyen IgG2a (por ejemplo IgG2a,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG2b (por ejemplo IgG2b,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ), IgG3 (por ejemplo IgG3,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) y anticuerpos IgM. Sin embargo, otros isotipos de anticuerpo también se encuentran comprendidos en la invención, incluyendo anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretorio, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o pueden ser utilizados para generar fragmentos de unión a antígeno de los mismos, incluyendo, por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, entre los fragmentos de unión a antígeno se incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión, que comprenden: (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) que se fusiona con un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH<sub>2</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, e (iii) una región constante CH<sub>3</sub> de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH<sub>2</sub>. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se dan a conocer adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y 2003/0133939.

Los anticuerpos de la presente invención preferentemente se disocian de CLD18 con una constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ) de aproximadamente 1 a 100 nM o menos. Preferentemente, los anticuerpos de la invención no presentan reactividad cruzada con antígenos de superficie celular relacionados y, de esta manera, no inhiben su función.

En las formas de realización preferidas, los anticuerpos de la presente invención pueden caracterizarse por una o más de las propiedades siguientes:

- a) especificidad para CLD18, en particular especificidad para CLD18A2,
- b) afinidad de unión para CLD18, en particular para CLD18A2, de aproximadamente 100 nM o menos, preferentemente de aproximadamente 5 a 10 nM o menos y, más preferentemente, de aproximadamente 1 a 3 nM o menos,
- c) la capacidad de mediar en un nivel elevado de CDC sobre células negativas para CD55/59 o positivas para CD55/59,
- d) la capacidad de inhibir el crecimiento de células que expresan CLD18,
- e) la capacidad de inducir la apoptosis de células que expresan CLD18,
- f) la capacidad de inducir adhesión homotípica de células que expresan CLD18,
- g) la capacidad de inducir ADCC de células que expresan CLD18 en presencia de células efectoras,
- h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que presenta células tumorales que expresan CLD18,
- i) la capacidad de reducir el número de células que expresan CLD18,
- j) la capacidad de reducir el número de células que expresan niveles bajos de CLD18 y/o
- k) la capacidad de agregar CLD18 sobre la superficie de las células vivas.

Los anticuerpos anti-CLD18 de la presente invención pueden derivatizarse, unirse o coexpresarse con otras especificidades de unión. En una forma de realización particular, la invención proporciona una molécula biespecífica

o multiespecífica que comprende por lo menos una primera especificidad de unión para CLD18 (por ejemplo un anticuerpo anti-CLD18 o un mimético del mismo) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo un receptor de Fc- $\gamma$ , tal como Fc- $\gamma$  RI o cualquier otro receptor de Fc) o un receptor de célula T, por ejemplo CD3.

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CLD18 como a un receptor de Fc o a un receptor de célula T, por ejemplo CD3. Son ejemplos de receptores de Fc, los receptores de IgG, los receptores de Fc- $\gamma$  (Fc $\gamma$ R), tales como Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) y Fc $\gamma$ RIII (CD16). Otros receptores de Fc, tales como los receptores de IgA (por ejemplo Fc $\alpha$ RI) también pueden ser dianas. El receptor de Fc preferentemente se localiza sobre la superficie de una célula efectora, por ejemplo un monocito, macrófago o célula mononuclear activada. En una forma de realización preferente, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es diferente del sitio de unión de Fc de inmunoglobulina (por ejemplo IgG o IgA) del receptor. Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no resulta bloqueado por niveles fisiológicos de inmunoglobulinas.

Todavía en otro aspecto, los anticuerpos anti-CLD18 de la invención derivan, se unen o se coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo otro péptido o proteína (por ejemplo un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otra manera) a otra u otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo para producir un inmunoconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente invención puede unirse a otras fracciones terapéuticas, por ejemplo a un isótopo radioactivo, a un fármaco anticáncer de molécula pequeña, o a una citocina o quimoquina recombinante. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención comprende una gran diversidad de conjugados de anticuerpo, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y proteínas de fusión, la totalidad de las cuales se unen a las células que expresan CLD18 y que pueden utilizarse para dirigir otras moléculas a dichas células.

En todavía otro aspecto, la invención proporciona composiciones, por ejemplo productos farmacéuticos y composiciones/kits farmacéuticos y diagnósticos, que comprenden un portador farmacéuticamente aceptable formulado conjuntamente con un anticuerpo o con una combinación de anticuerpos de la invención. En una forma de realización particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se une a diferentes epítomos o que presenta características funcionales claras, tales como la inducción de CDC y/o ADCC y la inducción de apoptosis. En la presente forma de realización de la invención, los anticuerpos pueden utilizarse en combinación, por ejemplo en forma de una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CLD18. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLD18 que presentan actividades diferentes pero complementarias pueden combinarse en una única terapia para conseguir un efecto terapéutico deseado. En una forma de realización preferida, la composición incluye un anticuerpo anti-CLD18 que media en la CDC en combinación con otro anticuerpo anti-CLD18 que induce apoptosis. En otra forma de realización, la composición incluye un anticuerpo anti-CLD18 que media en la eliminación altamente efectiva de células diana en presencia de células efectoras, en combinación con otro anticuerpo anti-CLD18 que inhibe el crecimiento de células que expresan CLD18.

La presente invención incluye además la administración simultánea o secuencia de dos o más anticuerpos anti-CLD18 de la invención, en la que por lo menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-CLD18 quimérico y por lo menos un anticuerpo adicional es un anticuerpo anti-CLD18 humano, uniéndose los anticuerpos a los mismos epítomos o a epítomos diferentes de CLD18. Preferentemente, en primer lugar se administra un anticuerpo de CLD18 quimérico de la invención, seguido de la administración de un anticuerpo anti-CLD18 humano de la invención, en el que el anticuerpo anti-CLD18 humano preferentemente se administra durante un periodo de tiempo prolongado, es decir, en forma de terapia de mantenimiento.

Los anticuerpos, inmunoconjugados, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y composiciones de la presente invención pueden utilizarse en una diversidad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 y/o que eliminan selectivamente células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 mediante la puesta en contacto de las células con una cantidad efectiva del anticuerpo, inmunoconjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición, de manera que se inhibe el crecimiento de la célula y/o se elimina la célula. En una forma de realización, el procedimiento incluye la destrucción de la célula que expresa CLD18, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o mediante combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan CLD18 que pueden inhibirse o eliminarse utilizando los anticuerpos de la invención se incluyen células de cáncer tales como las células tumorógenas de estómago, pancreáticas, esofágicas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades que implican a las células que expresan CLD18 administrando los anticuerpos a los pacientes que padecen dichas enfermedades. Las enfermedades ejemplificativas que pueden tratarse (es decir, mejorarse) o prevenirse incluyen, de manera no limitativa, las enfermedades oncógenas. Los ejemplos de enfermedades oncógenas, que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen el cáncer gástrico, el cáncer pancreático, el cáncer

esofágico, el cáncer de pulmón, el cáncer ovárico, el cáncer colorrectal, el cáncer hepático, el cáncer de cabeza y cuello, y el cáncer de la vesícula biliar.

En una forma de realización particular de la invención, el sujeto en el que se administra el anticuerpo es tratado adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o agente que modula, por ejemplo que intensifica o que inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo de un receptor de Fc- $\gamma$ , tal como una citocina. Entre las citocinas típicas para la administración durante el tratamiento se incluyen el factor estimulante de las colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Entre los agentes terapéuticos típicos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como la doxorrubicina, el cisplatino, el Taxotere, el 5-fluorouracilo, el metotrexato, la gemcitabina y la ciclofosfamida.

Los anticuerpos de la presente invención pueden obtenerse mediante una estrategia de inmunización para animales no humanos, tales como ratones, con CLD18 humana o con un fragmento peptídico de la misma, preferentemente CLD18A2 o un fragmento de la misma con el fin de obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son aquellos seleccionados de entre el grupo que consiste de SEC ID n° 2, n° 4, n° 6, n° 16, n° 20 a n° 23, n° 26 a n° 31. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, en formas de realización preferidas, los anticuerpos de la invención son aquellos obtenidos mediante inmunización con péptidos seleccionados de entre el grupo que consiste de SEC ID n° 2, n° 4, n° 6, n° 16, n° 20 a n° 23, n° 26 a n° 31. Análogamente, los anticuerpos de CLD18 pueden generarse en un animal no humano transgénico, tal como un ratón transgénico. El animal no humano transgénico puede ser un ratón transgénico que presenta un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera codificante de la totalidad o una parte de un anticuerpo.

Pueden inmunizarse animales no humanos de tipo salvaje, así como transgénicos, con una preparación purificada o enriquecida de antígeno y/o ácidos nucleicos de CLD18 y/o células que expresan CLD18 o un fragmento peptídico de la misma. Preferentemente, el animal no humano es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos de CLD18 (por ejemplo IgG, IgA y/o IgM) experimentando recombinación V-D-J e intercambio de isotipos. El intercambio de isotipos puede producirse mediante, por ejemplo intercambio de isotipos clásico o no clásico.

Las células B aisladas obtenidas a partir de un animal no humano tal como se ha indicado anteriormente pueden inmortalizarse a continuación mediante fusión con una célula inmortalizada, proporcionando una fuente (por ejemplo un hibridoma) de anticuerpos de la invención. Este tipo de hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la invención) también se encuentran incluidos dentro del alcance de la invención.

Tal como se ejemplifica en la presente memoria, los anticuerpos de la invención pueden obtenerse directamente a partir de hibridomas que expresan el anticuerpo, o pueden clonarse y expresarse recombinantemente en una célula huésped (por ejemplo una célula CHO o una célula linfocítica). Son ejemplos adicionales de células huésped algunos microorganismos tales como *E. coli* y hongos, tales como levaduras. Alternativamente, pueden producirse recombinantemente en un animal o planta no humano transgénico.

Son células de hibridoma para producir anticuerpos descritos en la presente invención por ejemplo aquéllas secuencias o depositadas en DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Alemania; nueva dirección: Inhoffenstr. 7B, 31824 Braunschweig, Alemania), que presentan los nombres y números de acceso siguientes:

- a. 182-D1106-055, n° de acceso DSM ACC2737, depositado el 19 de octubre de 2005.
- b. 182-D1106-056, n° de acceso DSM ACC2738, depositado el 19 de octubre de 2005.
- c. 182-D1106-057, n° de acceso DSM ACC2739, depositado el 19 de octubre de 2005.
- d. 182-D1106-058, n° de acceso DSM ACC2740, depositado el 19 de octubre de 2005.
- e. 182-D1106-059, n° de acceso DSM ACC2741, depositado el 19 de octubre de 2005.
- f. 182-D1106-062, n° de acceso DSM ACC2742, depositado el 19 de octubre de 2005.
- g. 182-D1106-067, n° de acceso DSM ACC2743, depositado el 19 de octubre de 2005.
- h. 182-D758-035, n° de acceso DSM ACC2745, depositado el 17 de noviembre de 2005.
- i. 182-D758-036, n° de acceso DSM ACC2746, depositado el 17 de noviembre de 2005.
- j. 182-D758-040, n° de acceso DSM ACC2747, depositado el 17 de noviembre de 2005.
- k. 182-D1106-061, n° de acceso DSM ACC2748, depositado el 17 de noviembre de 2005.
- l. 182-D1106-279, n° de acceso DSM ACC2808, depositado el 26 de octubre de 2006.
- m. 182-D1106-294, n° de acceso DSM ACC2809, depositado el 26 de octubre de 2006.
- n. 182-D1106-362, n° de acceso DSM ACC2810, depositado el 26 de octubre de 2006.

Los anticuerpos preferidos de la invención son aquellos producidos y obtenibles a partir de los hibridomas anteriormente indicados, es decir, 37G11 en el caso de 182-D1106-055, 37H8 en el caso de 182-D1106-056, 38G5 en el caso de 182-D1106-057, 38H3 en el caso de 182-D1106-058, 39F11 en el caso de 182-D1106-059, 43A11 en el caso de 182-D1106-062, 61C2 en el caso de 182-D1106-067, 26B5 en el caso de 182-D758-035, 26D12 en el caso de 182-D758-036, 28D10 en el caso de 182-D758-040, 42E12 en el caso de 182-D1106-061, 125E1 en el caso

de 182-D1106-279, 163E12 en el caso de 182-D1106-294 y 175D10 en el caso de 182-D1106-362, y las formas quimerizadas y humanizadas de los mismos.

5 En formas de realización preferidas, entre los anticuerpos, en particular formas quimerizadas de anticuerpos según la invención, se incluyen los anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 46 o nº 150. En formas de realización preferidas adicionales, entre los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos según la invención, se incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena ligera (CL) que comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena ligera humana, tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 41 o nº 148. En una forma de realización preferente particular, entre las formas quimerizadas particulares de anticuerpos según la invención se incluyen los anticuerpos que comprenden una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CH humana, tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 46 o nº 150 y que comprende una CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana, tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 41 o nº 148.

20 Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 46 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 45. Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 150 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 149. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 41 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 40. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 148 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 147.

25 Las formas quimerizadas de los anticuerpos pueden incluir los anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por SEC ID nº: 115, 116, 117, 118, 119, 120 y un fragmento de la misma y/o que comprenden una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo constituido por SEC ID nº: 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129 y un fragmento de la misma.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen los anticuerpos que comprenden una combinación de cadenas pesadas y cadenas ligeras seleccionadas de entre las posibilidades (i) a (ix) siguientes:

- 35 (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 115 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 122,
- (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 116 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 121,
- 40 (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 117 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 123,
- (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 119 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 126,
- 45 (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 118 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 125,
- 50 (vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 124,
- (vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 127,
- 55 (viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 128, y
- (ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 129.
- 60

El término "fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" tal como se ha utilizado anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpo, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpo acortada en el extremo N-terminal y/o C-terminal, que, al sustituir dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo conserva la capacidad de unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo descritas en la presente memoria, por ejemplo la lisis mediada por CDC o la lisis mediada por ADCC.

65

Preferentemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende por lo menos 80%, preferentemente por lo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ó 99% de los residuos aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 115, nº 116, nº 117, nº 118, nº 119, nº 120, nº 121, nº 122, nº 123, nº 124, nº 125, nº 126, nº 127, nº 128 y nº 129 preferentemente se refiere a dicha secuencia, en la que 17, 18, 19, 20, 21, 22 ó 23 aminoácidos en el extremo N-terminal han sido eliminados. Los fragmentos de las secuencias de aminoácidos indicadas en la presente memoria pueden encontrarse codificadas por fragmentos respectivos de secuencias de ácidos nucleicos codificantes de dichas secuencias de aminoácidos.

Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 115 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 100. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 116 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 101. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 117 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 102. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 119 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 104. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 118 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 103. Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 105.

Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 122 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 107. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 121 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 106. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 123 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 108. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 126 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 111. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 125 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC IDS nº 110. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 124 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 109. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 127 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 112. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 128 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 113. Una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 129 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 114.

Un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 132, nº 133, nº 134, nº 135, nº 136, nº 137.

Un anticuerpo de la invención comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste de SEC ID nº 138, nº 139, nº 140, nº 141, nº 142, nº 143, nº 144, nº 145, nº 146.

Un anticuerpo de la invención comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL) seleccionados de entre las posibilidades (i) a (ix) siguientes:

- (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 132 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 139,
- (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 133 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 138,
- (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 134 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 140,
- (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 136 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 143,

- (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 135 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 142,
- 5 (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 137 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 141,
- (vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 137 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 144,
- 10 (viii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 137 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 145,
- (ix) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 137 y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 146.

15 Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 132 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 55. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 133 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 56.

20 Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 134 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 57. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 136 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 59. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 135 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 58.

25 Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 137 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 60.

30 Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 139 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 62. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 138 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 61. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 140 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 63. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 143 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 66. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 142 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 65. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 141 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 64. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 144 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 67. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 145 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 68. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SC ID nº 146 puede encontrarse codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácidos nucleicos representada por SEC ID nº 69.

50 Un anticuerpo de la invención comprende una VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionado de entre las formas de realización (i) a (vi) siguientes:

- (i) CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 115; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 115; CDR3: posiciones 116 a 125 de SEC ID nº 115,
- 55 (ii) CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 116; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 116; CDR3: posiciones 116 a 126 de SEC ID nº 116,
- (iii) CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 117; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 117; CDR3: posiciones 116 a 124 de SEC ID nº 117,
- 60 (iv) CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 118; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 118; CDR3: posiciones 116 a 126 de SEC ID nº 118,
- (v) CDR1: posiciones 44 a 51 de SEC ID nº 119; CDR2: posiciones 69 a 76 de SEC ID nº 119; CDR3: posiciones 115 a 125 de SEC ID nº 119, y
- 65

- (vi) CDR1: posiciones 45 a 53 de SEC ID nº 120; CDR2: posiciones 71 a 78 de SEC ID nº 120; CDR3: posiciones 117 a 128 de SEC ID nº 120.

5 Un anticuerpo de la invención comprende una VL que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de entre las realizaciones (i) a (ix) siguientes:

- (i) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 121; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 121; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 121,
- 10 (ii) CDR1: posiciones 49 a 53 de SEC ID nº 122; CDR2: posiciones 71 a 73 de SEC ID nº 122; CDR3: posiciones 110 a 118 de SEC ID nº 122,
- (iii) CDR1: posiciones 47 a 52 de SEC ID nº 123; CDR2: posiciones 70 a 72 de SEC ID nº 123; CDR3: posiciones 109 a 117 de SEC ID nº 123,
- 15 (iv) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 124; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 124; CDR3: posiciones 115 a 113 de SEC ID nº 124,
- (v) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 125; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 125; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 125,
- 20 (vi) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 126; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 126; CDR3: posiciones 115 a 122 de SEC ID nº 126,
- (vii) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 127; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 127; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 127,
- 25 (viii) CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 128; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 128; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 128,
- 30 (ix) CDR1: posiciones 47 a 52 de SEC ID nº 129; CDR2: posiciones 70 a 72 de SEC ID nº 129; CDR3: posiciones 109 a 117 de SEC ID nº 129.

35 Un anticuerpo de la invención comprende una combinación de VH y VL, comprendiendo cada uno un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de entre las formas de realización (i) a (ix) siguientes:

- (i) VH: CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 115; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 115; CDR3: posiciones 116 a 125 de SEC ID nº 115; VL: CDR1: posiciones 49 a 53 de SEC ID nº 122; CDR2: posiciones 71 a 73 de SEC ID nº 122; CDR3: posiciones 110 a 118 de SEC ID nº 122,
- 40 (ii) VH: CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 116; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 116; CDR3: posiciones 116 a 126 de SEC ID nº 116; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 121; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 121; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 121,
- 45 (iii) VH: CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 117; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 117; CDR3: posiciones 116 a 124 de SEC ID nº 117; VL: CDR1: posiciones 47 a 52 de SEC ID nº 123; CDR2: posiciones 70 a 72 de SEC ID nº 123; CDR3: posiciones 109 a 117 de SEC ID nº 123,
- 50 (iv) VH: CDR1: posiciones 44 a 51 de SEC ID nº 119; CDR2: posiciones 69 a 76 de SEC ID nº 119; CDR3: posiciones 115 a 125 de SEC ID nº 119; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 126; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 126; CDR3: posiciones 115 a 122 de SEC ID nº 126,
- (v) VH: CDR1: posiciones 45 a 52 de SEC ID nº 118; CDR2: posiciones 70 a 77 de SEC ID nº 118; CDR3: posiciones 116 a 126 de SEC ID nº 118; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 125; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 125; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 125,
- 55 (vi) VH: CDR1: posiciones 45 a 53 de SEC ID nº 120; CDR2: posiciones 71 a 78 de SEC ID nº 120; CDR3: posiciones 117 a 128 de SEC ID nº 120; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 124; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 124; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 124,
- 60 (vii) VH: CDR1: posiciones 45 a 53 de SEC ID nº 120; CDR2: posiciones 71 a 78 de SEC ID nº 120; CDR3: posiciones 117 a 128 de SEC ID nº 120; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 127; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 127; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 127,
- 65

(viii) VH: CDR1: posiciones 45 a 53 de SEC ID nº 120; CDR2: posiciones 71 a 78 de SEC ID nº 120; CDR3: posiciones 117 a 128 de SEC ID nº 120; VL: CDR1: posiciones 47 a 58 de SEC ID nº 128; CDR2: posiciones 76 a 78 de SEC ID nº 128; CDR3: posiciones 115 a 123 de SEC ID nº 128, y

5 (ix) VH: CDR1: posiciones 45 a 53 de SEC ID nº 120; CDR2: posiciones 71 a 78 de SEC ID nº 120; CDR3: posiciones 117 a 128 de SEC ID nº 120; VL: CDR1: posiciones 47 a 52 de SEC ID nº 129; CDR2: posiciones 70 a 72 de SEC ID nº 129; CDR3: posiciones 109 a 117 de SEC ID nº 129.

10 Un anticuerpo de la invención preferentemente comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferentemente por lo menos la región variable de CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18, preferentemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 descrito en la presente memoria, y preferentemente comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferentemente por lo menos la región variable de CDR3, de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de las regiones variables de cadena ligera (VL) indicadas en la presente memoria. En una forma de realización, dicha región o regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de entre un conjunto de regiones determinantes de complementariedad, CDR1, CDR2 y CDR3 indicadas en la presente memoria. En una forma de realización particularmente preferente, un anticuerpo de la invención preferentemente comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18, preferentemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 indicado en la presente memoria, y preferentemente comprende las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o de las regiones variables de cadena ligera (VL) indicadas en la presente memoria.

25 Un anticuerpo de la invención que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR tal como se indica en la presente memoria, comprende dichas CDR conjuntamente con sus regiones de marco intermedias. Preferentemente, la parte también incluye por lo menos aproximadamente 50% de la primera o cuarta región de marco o de ambas, siendo el 50%, el 50% C-terminal de la primera región de marco y el 50% N-terminal de la cuarta región de marco. La construcción de anticuerpos de la presente invención preparados mediante técnicas de ADN recombinante puede resultar en la introducción de residuos en el lado N-terminal o C-terminal de las regiones variables codificadas por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluyendo la introducción de conectores para unir regiones variables de la invención a secuencias proteicas adicionales, incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcajes de proteína.

35 Un anticuerpo de la invención que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR tal como se indica en la presente memoria, comprende dichas CDR en una región de marco de anticuerpo humano.

40 La referencia en la presente memoria a un anticuerpo que comprende con respecto a la cadena pesada del mismo una cadena particular, o una región o secuencia particular, preferentemente se refiere a una situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto resulta aplicable, análogamente, a la cadena ligera de un anticuerpo.

45 La presente memoria describe asimismo a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos codificantes de anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo una cadena de anticuerpo, tal como se indica en la presente memoria. Los ácidos nucleicos pueden encontrarse comprendidos en un vector, por ejemplo un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado, por ejemplo, convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender genes adicionales, tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuado y bajo condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de la expresión que permiten la expresión correcta de las regiones codificantes en huéspedes adecuados. Dichos elementos de control son conocidos por el experto en la materia y entre ellos pueden incluirse un promotor, un casete de corte y empalme y un codón de inicio de la traducción.

55 El ácido nucleico puede estar unido funcionalmente a las secuencias de control de la expresión anteriormente indicadas, permitiendo la expresión en células eucarióticas o procarióticas. Los elementos de control que garantizan la expresión en las células eucarióticas o procarióticas son bien conocidos por el experto en la materia.

60 Los métodos de construcción de las moléculas de ácidos nucleicos, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácidos nucleicos anteriormente indicadas, para la introducción de los vectores en células huésped apropiadamente seleccionados, o para provocar o conseguir la expresión, son bien conocidos de la técnica.

65 Otras características y ventajas de la presente invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada y reivindicaciones siguientes.

**Breve descripción de los dibujos**

- 5 La fig. 1 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 acoplado a un fluorocromo verde y que se ha hecho reaccionar con suero de ratón tras la inmunización con ADN de SEC ID nº 15 fusionado con un epítopo ayudante.
- 10 La fig. 2 muestra un análisis de transferencia western de células HEK293 transfectadas con CLD18A2-myc (SEC ID nº 3) y células HEK293 no transfectadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-myc 9E11 (Serotec, CRL MCA2200).
- 15 La fig. 3 muestra un análisis de inmunofluorescencia con células CHO transfectadas con CLD18A2 y un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).
- 20 Las figs. 4A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 24H5 y 85A3 a células HEK293 transfectadas transitoriamente con CLD18A2 humano y un marcador fluorescente según se determina mediante citometría de flujo. La figura 4C muestra la unión de los sobrenadantes de hibridoma 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 a células HEK293 transfectadas establemente con CLD18A2 humano y contratendidas con yoduro de propidio.
- 25 La fig. 5 muestra la unión de los sobrenadantes de hibridoma 24H5 (A), 9E8 (B), 26B5 (C) y 19B9 (D) a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y con CLD18A2 ó CLD18A2-Myc o CLD18A2-HA analizados mediante citometría de flujo.
- 30 Las figs. 6A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 37H8, 43A11, 45C1 y 163E12 a células HEK293 transfectadas establemente con CLD18A2 ó CLD18A1 humano según se determina mediante citometría de flujo.
- 35 La fig. 7 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal 37G1 específico de la isoforma CLD18A2 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones nativas (A, B) y de fijación con paraformaldehído (C, D).
- 40 La fig. 8 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal de CLD18 26B5 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones nativas (A, B) y de fijación con paraformaldehído (C, D).
- 45 Fig. 9. RT-PCR de líneas celulares.  
El análisis de RT-PCR con cebadores específicos para CLD18A2 mostró una clara expresión en 4/5 de las líneas celulares sometidas a ensayo.
- 50 La fig. 10 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células DAN-G (subclón F2) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).
- 55 La fig. 11 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células KATO-III (subclón 3B9 4D5) y un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).
- 60 La fig. 12A muestra un análisis de inmunofluorescencia de células SNU-16 (subclón G5) con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000). La fig. 12B muestra un análisis de inmunofluorescencia de células KATO-III con anticuerpos monoclonales de la invención.
- 65 La fig. 13 muestra la expresión en superficie de CLD18 sobre células KATO-III y NUGC-4 analizada mediante tinción de las células con los anticuerpos monoclonales 61C2 y 163E12, seguido del análisis de citometría de flujo.
- Fig. 14. Alineación de proteínas de CLD18A1 humano (NP\_057453), CLD18A2 humano (NP\_001002026), CLD18A1 de ratón (NP\_062789) y CLD18A2 de ratón (AAL15636).
- Las figs. 15A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 y 163E12, respectivamente, a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y CLD18A1 ó CLD18A2 murino según análisis de citometría de flujo.
- Fig. 16. Análisis inmunohistoquímicos con anticuerpo policlonal p105.
- Las tinciones inmunohistoquímicas de un subconjunto de tejidos normales (estómago, pulmón, médula ósea y próstata) confirman la especificidad para el tejido gástrico (A). La expresión también se detectó en carcinomas de estómago (fila superior) y en carcinomas pulmonares (B). Sólo las células diferenciadas pero no las células madre expresan CLD18A2 (C).

Fig. 17. Análisis inmunohistoquímicos con anticuerpo monoclonal 39F11D7.

5 (A) La expresión específica de proteínas se detectó en mucosa de estómago normal, mientras que todos los tejidos normales sometidos a ensayo fueron negativos.

(B) Se observó una fuerte expresión de CLD18A2 en los carcinomas de estómago y de pulmón.

10 Fig. 18. Análisis inmunohistoquímicos con los anticuerpos monoclonales 26B5 (A), 175D10 (B), 43A11 (C), 163E12 (D) y 45C1 (E). Todos los anticuerpos mostraron una fuerte tinción de los tumores xenoinjertados HEK293-CLD18A2 y de los especímenes de cáncer gástrico, pero no de los tumores transfectados de células HEK293 de control simuladamente transfectadas.

15 La fig. 19 es un gráfico que compara el porcentaje de células muertas tras la inducción de CDC por los anticuerpos 85A3, 28D10, 24H5 ó 26D12 contra células HEK293 establemente transfectadas con CLD18A2 humano según citometría de flujo.

20 La fig. 20 es un gráfico que compara el porcentaje de lisis celular específica tras la inducción de CDC por los anticuerpos 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12 ó 61C2 contra células CHO adherentes establemente transfectadas con CLD18A2 ó CLD18A1 humano según se determinó mediante medición fluorescente.

25 La fig. 21 muestra la inducción dependiente de la concentración de CDC contra las células CHO establemente transfectadas con CLD18A2 humano por los anticuerpos 75B8 (A), 28D10 (B) ó 37H8 (C) según se determinó mediante medición fluorescente.

La fig. 22 muestra la lisis de las células HEK293-CLD18A2 por los anticuerpos 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de células MNC.

30 La fig. 23 muestra la lisis de las células HEK293-CLD18A1 por los anticuerpos 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de células MNC.

35 La fig. 24 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz con células HEK293-CLD18A2.

Las figs. 25A y B muestran la supervivencia prolongada mediante el tratamiento con anticuerpos de la invención en dos modelos de xenoinjerto de tratamiento precoz con células HEK293-CLD18A2.

40 La fig. 26 muestra la prolongación de la supervivencia por anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado con células HEK293-CLD18A2.

45 La fig. 27A muestra la inhibición del crecimiento tumoral con anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz. La fig. 27B muestra la prolongación de la supervivencia por anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz. Se utilizaron células DAN-G de expresión endógena de CLD18A2.

50 La fig. 28 muestra la expresión de ARNm de CLD18A2 en tejidos de ratón. Los análisis de RT-PCR con cebadores específicos de CLD18A2 no mostraron expresión significativa en ninguno de los tejidos normales sometidos a ensayo excepto en el estómago. Se analizaron los tejidos normales siguientes: 1: intestino delgado; 2: bazo; 3: piel; 4: estómago; 5: pulmón; 6: páncreas; 7: nódulo linfático; 8: timo; 9: control negativo.

55 La fig. 29 muestra la expresión de CLD18 en estómago normal. El análisis inmunohistoquímico con anticuerpo específico de CLD18 de estómago de ratón revela un patrón de expresión conservado. Aunque los epitelios superficiales y las criptas más profundas expresaban CLD18 en la superficie celular, la región central del cuello era negativa para CLD18.

60 La fig. 30 muestra la tinción de hematoxilina-eosina de tejidos de estómago de ratón. Se muestra una vista general (A) y de detalle (B) del estómago de un ratón tratado con 37G11 en comparación con un ratón de control (C y D), que fue tratado con únicamente PBS.

Las figs. 31A y B muestra la tinción de citometría de flujo de células HEK293 establemente transfectadas con CLD18A1 y A2 humano, respectivamente, así como de células KATO-III de expresión endógena con anticuerpos de la invención (43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10).

65 La fig. 32 muestra la CDC de células que expresan CLD18A2 mediada por anticuerpos quiméricos de la invención.

La fig. 33 muestra la ADCC de células KATO-III mediada por anticuerpos quiméricos de la invención.

### Descripción detallada de la invención

5 Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente sobre CLD18. Entre los anticuerpos monoclonales aislados comprendidos dentro de la presente invención se incluyen los anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD. En una forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un IgG1, kappa o IgG1, isotipo lambda. En otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo kappa de IgG3 ó IgG3, isotipo lambda. En todavía otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo kappa de IgG4 ó IgG4, isotipo lambda. En todavía otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 ó IgA2. En todavía otra forma de realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

15 En una forma de realización, la invención se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a células que expresan CLD18, y que preferentemente: (i) se unen a células que expresan CLD18A2, e (ii) no se unen a células que no expresan CLD18A2 pero que expresan CLD18A1. Los anticuerpos de la invención preferentemente: (i) median en la eliminación de las células que expresan CLD18A2, e (ii) no median en la eliminación de las células que no expresan CLD18A2 pero que expresan CLD18A1.

20 En otra forma de realización, la invención se refiere a anticuerpos que: (i) se unen a células tumorales que expresan CLD18, (ii) no se unen a células que expresan CLD18 de mucosa de estómago normal, y/o (iii) no se unen a células que expresan CLD18 de tejido pulmonar no canceroso.

25 La invención incluye además anticuerpos que: (i) median en la eliminación de células tumorales que expresan CLD18, (ii) no median en la eliminación de células que expresan CLD18 de mucosa de estómago normal, y/o (iii) no median en la eliminación de células que expresan CLD18 de tejido pulmonar no canceroso.

30 En formas de realización particulares, los anticuerpos de la invención (i) se unen a un epítipo sobre CLD18A2 que no se encuentra presente sobre CLD18A1, preferentemente SEC ID nº 21, nº 22 y nº 23, (ii) se unen a un epítipo localizado sobre CLD18A2-bucle1, preferentemente SEC ID nº 28, (iii) se unen a un epítipo localizado sobre CLD18A2-bucle2, preferentemente SEC ID nº: 31, (iv) se unen a un epítipo que comprende CLD18A2-bucle1 y CLD18A2-bucleD3, (v) se unen a un epítipo no glucosilado localizado sobre CLD18A2-bucleD3, preferentemente SEC ID nº: 29, o (vi) se unen a un epítipo presente en CLD18 humano y de ratón (SEC ID nº 2, SEC ID nº 8 y SEC ID n 35, SEC ID nº 37, respectivamente).

35 En formas de realización particularmente preferentes, los anticuerpos de la invención se unen a un epítipo de CLD18A2 que no se encuentra presente sobre CLD18A1.

40 Entre los anticuerpos de la invención se incluyen algunos anticuerpos totalmente humanos. Dichos anticuerpos pueden ser producidos en un animal transgénico no humano, por ejemplo en un ratón transgénico, capaz e producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos de CLD18 mediante recombinación V-D-J e intercambio de isotipos. Dicho animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para la producción de anticuerpos policlonales, tal como se da a conocer en la patente US nº 2003/0017534.

45 La unión de un anticuerpo de la invención al antígeno CLD18 puede mediar en la destrucción de las células que expresan CLD18 (por ejemplo, una célula tumoral), por ejemplo mediante la activación del sistema de complemento. La destrucción de las células que expresan CLD18 puede producirse mediante uno o más de los mecanismos siguientes: citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) de las células que expresan CLD18; apoptosis de las células que expresan CLD18; fagocitosis de célula efectora de las células que expresan CLD18; o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo de célula efectora (ADCC) de las células que expresan CLD18.

50 Con el fin de que la presente invención se entienda con mayor facilidad, en primer lugar se definen determinados términos. Se proporcionan definiciones adicionales durante toda la descripción detallada.

### 55 Definición de términos

El término "CLD18" se refiere a la claudina-18 e incluye cualesquiera variantes, incluyendo CLD18A1 y CLD18A2, conformaciones, isoformas y homólogos específicos de CLD18 que se expresan naturalmente en las células o que se expresan en células transfectadas con el gen CLD18. Preferentemente, "CLD18" se refiere a CLD18 humano, en particular CLD18A2 (SEC ID nº 1, nº 2) y/o CLD18A1 (SEC ID nº 7, nº 8), más preferentemente CLD18A2.

60 El término "CLD18A1" incluye las variantes modificadas post-traduccionalmente, isoformas y homólogos específicos de CLD18A1 humano naturalmente expresados por las células o que se expresan sobre células transfectadas con el gen CLD18A1.

65

El término "CLD18A2" incluye variantes modificadas post-traduccionalmente, isoformas y homólogos específicos de CLD18A2 humano naturalmente expresados por las células o que se expresan sobre células transfectadas con el gen CLD18A2.

5 La expresión "variante de CLD18" debe comprender: (i) las variantes de corte y empalme de CLD18, (ii) las variantes de CLD18 modificadas post-traduccionalmente, particularmente incluyendo variantes con diferentes estados de N-glucosilación, (iii) variantes de conformación de CLD18, particularmente incluyendo CLD18-Conformación-1, CLD18-Conformación-2 y CLD18-Conformación-3, (iv) variantes de CLD18 libre y homotípica/heterotípicamente asociadas y localizadas en uniones estrechas intercelulares, y (v) variantes relacionadas con células de cáncer CLD18 y con  
10 células no de cáncer CLD18.

El término "balsa" se refiere a microdominios membranales ricos en esfingolípidos y en colesterol situados en el área de la cara externa de la membrana plasmática de una célula. La capacidad de determinadas proteínas de asociarse dentro de dichos dominios y su capacidad de formar "agregados" o "agregados focales" puede realizar la función de  
15 la proteína. Por ejemplo, la traslocación de moléculas de CLD18 al interior de dichas estructuras, tras unirse a los anticuerpos de la presente invención, crean una densidad elevada de complejos de antígeno CLD18-anticuerpo en las membranas plasmáticas. Dicha densidad elevada de complejos de antígeno CLD18-anticuerpo permite la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

20 Los términos "conformación" y "topología" se refieren a cómo una molécula integral de membrana se sitúa en la membrana de superficie celular y, en particular, cuáles de sus regiones son extracelulares y, de esta manera, elegibles para los anticuerpos. Por ejemplo, CLD18 puede existir en tres conformaciones diferentes, que con toda probabilidad dependen de si predomina como homómero o heterómero y de si se encuentra integrado en estructuras supramoleculares de unión estrecha o se encuentra "libre". Estos diferentes estados resultan en diferentes epítomos  
25 elegibles para los anticuerpos.

Según la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo el cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas en la presente memoria.

30 El término "tumor" se refiere a un grupo anormal de células o tejido que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y que continúa creciendo tras cesar los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y habitualmente forman una masa diferenciada de tejido, que puede ser benigna o maligna.

35 El término "metástasis" se refiere a la diseminación de las células de cáncer desde su sitio originario a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas a partir del tumor primario, de la invasión de la matriz extracelular, de la penetración de las membranas basales endoteliales y la entrada en la cavidad corporal y los vasos y, tras el transporte por la sangre, de la infiltración de los órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la  
40 angiogénesis. Con frecuencia la metástasis tumoral se produce incluso tras la extirpación del tumor primario, debido a que pueden subsistir células o componentes tumorales y desarrollar potencial metastásico. En una forma de realización, el término "metástasis" según la invención se refiere a "metástasis distante", que se refiere a una metástasis alejada del tumor primario y del sistema regional de nódulos linfáticos.

45 La expresión "tratamiento de una enfermedad" incluye la curación, el acortamiento de la duración, la mejora, la prevención, el enlentecimiento o la inhibición de la progresión o del empeoramiento, o la prevención o retraso de la aparición de una enfermedad o de los síntomas de la misma.

Según la invención, una muestra puede ser cualquier muestra útil según la presente invención, en particular una  
50 muestra biológica tal como una muestra de tejido, incluyendo líquidos corporales y/o una muestra celular, y puede obtenerse de manera convencional, tal como mediante biopsia de tejido, incluyendo la biopsia por punción, y la extracción de sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros líquidos corporales. Según la invención, la expresión "muestra biológica" también incluye fracciones de muestras biológicas.

55 El término "anticuerpo" se refiere a una glucoproteína que comprende por lo menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno de las mismas. El término "anticuerpo" también incluye todas las formas recombinantes de los anticuerpos, en particular de los anticuerpos indicados en la presente memoria, por ejemplo anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glucosilados y cualesquiera fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno y derivados tal como se indica  
60 posteriormente. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente memoria como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente memoria como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de marco (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas de extremo  
65 aminoterminal a extremo carboxiterminal en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las

regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar en la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, incluyendo diversas células del sistema inmunológico (por ejemplo células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

5 La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que presenta un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana, en la que la estructura restante de inmunoglobulina de la molécula se basa en la estructura y/o en la secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con dominios  
10 constantes o únicamente las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en las regiones de marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno puede ser de tipo salvaje o modificados con una o más sustituciones de aminoácido, por ejemplo modificados para ser más similares a inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan la totalidad de las secuencias de CDR (por ejemplo un anticuerpo de ratón humanizado que contiene la totalidad de las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras  
15 formas presentan una o más CDR que se encuentran alteradas respecto al anticuerpo original.

La expresión "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una parte de cada una de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesadas y ligeras es homóloga respecto a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular,  
20 mientras que el segmento restante de las cadenas es homólogo respecto a las secuencias correspondientes de otra especie. Típicamente, la región variable de tanto las cadenas ligeras como las pesadas imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamífero, mientras que las partes constantes son homólogas respecto a las secuencias de anticuerpos derivadas de otra especie. Una clara ventaja de dichas formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas utilizando células B o  
25 hibridomas fácilmente disponibles de organismos huésped no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Aunque la región variable presenta la ventaja de su fácil preparación y de que la especificidad no resulta afectada por el origen, siendo humana la región constante, es menos probable que induzca una respuesta inmunológica de un sujeto humano al inyectar los anticuerpos que con la región constante de origen no humano. Sin embargo, la definición no se encuentra limitada al presente ejemplo particular.  
30

La expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de unión"), tal como se utiliza en la presente memoria, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede  
35 llevarse a cabo con fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Entre los ejemplos de fragmentos de unión comprendidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo se incluyen: (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten de los dominios VL, VH, CL y CH, (ii) fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos mediante un puente disulfuro en la región bisagra, (iii) fragmentos Fd que consisten de los dominios VH y CH, (iv) fragmentos Fv que consiste de los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), que consisten de un  
40 dominio VH, (vi) regiones determinantes de complementariedad (CDR) aisladas, y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que opcionalmente pueden unirse mediante un conector sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se encuentran codificados por genes separados, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que les permite prepararlos en forma de una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan formando moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv), ver, por ejemplo, Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también se pretende que se encuentren comprendidos dentro de la expresión "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional son las proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina, las cuales comprenden: (i) un polipéptido dominio de unión que se encuentra fusionado con un polipéptido región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región bisagra, e (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada con la región constante CH2. El polipéptido dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera. Las proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina se dan a conocer en mayor detalle en las patentes US nº 2003/0118592 y nº 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidas por el experto en la materia, y los fragmentos se criban para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.  
50  
55

El término "epitopo" se refiere a un determinante proteico capaz de unirse a un anticuerpo, en el que la expresión "de unión" en la presente memoria preferentemente se refiere a una unión específica. Los epítopos habitualmente consisten de agrupamientos superficiales de moléculas químicamente activos, tales como aminoácidos o cadenas laterales sacáridas y habitualmente presentan características específicas de estructura tridimensional, así como características de carga específicas. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión a los primeros, pero no a los segundos, se pierde en presencia de solventes desnaturizantes.  
60

La expresión "epítipo discontinuo" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un epítipo conformacional sobre un antígeno proteico que está formado de por lo menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

5 La expresión "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que presenta dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con: (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora. La expresión "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo una proteína, péptido o complejo de proteínas o péptidos, que presenta más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con: (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc sobre la superficie de una célula efectora, y (c) por lo menos otro componente. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la invención incluye, aunque sin limitación, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraespecíficas y otras moléculas multiespecíficas dirigidas contra CLD18 y contra otras dianas, tales como receptores de Fc sobre las células efectoras. La expresión "anticuerpos biespecíficos" también incluye los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos biespecíficos bivalentes en los que los dominios VH y VL se expresan en una única cadena polipeptídica, aunque utilizando un conector que es excesivamente corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, forzando de esta manera que los dominios se emparejen con dominios complementarios de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (ver, por ejemplo, Holliger P. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448, 1993; Poljak R.J. *et al.*, Structure 2:1121-1123, 1994).

La invención incluye además derivados de los anticuerpos indicados en la presente memoria. La expresión "derivados de anticuerpo" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Tal como se utiliza en la presente memoria, un anticuerpo "se deriva de" una secuencia de línea germinal particular en el caso de que el anticuerpo se obtenga de un sistema mediante inmunización de un animal o mediante cribado de una biblioteca de genes de inmunoglobulina, y en el que el anticuerpo seleccionado presenta una identidad de la secuencia de aminoácidos de por lo menos 90%, más preferentemente de por lo menos 95%, todavía más preferentemente de por lo menos 96%, 97%, 98% ó 99% respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia de línea germinal particular no mostrará más de 10 diferencias de aminoácido, más preferentemente, no más de 5, o todavía más preferentemente, no más de 4, 3, 2 ó 1 diferencia de aminoácido respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión a antígeno unidas entre sí, por los menos dos de las cuales presentan diferente especificidad. Entre estas diferentes especificidades se incluyen una especificidad de unión para un receptor de Fc sobre una célula efectora y una especificidad de unión para un antígeno o epítipo sobre una célula diana, por ejemplo una célula tumoral.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser anticuerpos humanos. La expresión "anticuerpo humano", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir anticuerpos que presentan regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo mutaciones introducidas mediante mutagénesis *in vitro* aleatoria o específica de sitio o mediante mutación somática *in vivo*).

La expresión "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una única composición molecular. Un anticuerpo monoclonal muestra una sola especificidad de unión y afinidad para un epítipo particular. En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales son producidos por un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo un ratón, fusionado con una célula inmortalizada.

La expresión "anticuerpo recombinante", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como: (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados a partir de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados a partir de una biblioteca combinatorial recombinante de anticuerpos, y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualesquiera otros medios que implican el corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina con otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye células huésped eucarióticas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/0, células HEK293, células HEK293T, células vegetales, u hongos, incluyendo células de levadura.

65

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación a un organismo transgénico que produce este tipo de anticuerpo. Esta expresión se refiere a un anticuerpo que presenta una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante que corresponde a la presente en un organismo que no consiste del organismo transgénico, y que se deriva generalmente de una especie que no es la del organismo transgénico.

10 Tal como se utiliza en la presente memoria, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que presenta cadenas ligeras y pesadas de diferentes orígenes de organismo. Por ejemplo, un anticuerpo que presenta una cadena pesada humana asociada a una cadena ligera murina es un anticuerpo heterohíbrido.

15 Los anticuerpos indicados en la presente memoria preferentemente han sido aislados. Un "anticuerpo aislado" tal como se utiliza en la presente memoria pretende referirse a un anticuerpo que se encuentra sustancialmente libre de otros anticuerpos que presentan diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLD18 se encuentra sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de CLD18). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de CLD18 humano puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo de otra especie (por ejemplo homólogos específicos de CLD18). Además, un anticuerpo aislado puede encontrarse sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o compuestos químicos. En una forma de realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que presentan diferentes especificidades y que se combinan en una composición bien definida.

20 Según la invención, la expresión "de unión" preferentemente se refiere a "de unión específica". Tal como se utiliza en la presente memoria, "de unión específica" se refiere a la unión de un anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  de aproximadamente  $1 \times 10^{-7}$  M o inferior, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una  $K_D$  que es por lo menos dos órdenes de magnitud inferior a su afinidad para la unión a un antígeno no específico (por ejemplo BSA, caseína) diferente del antígeno predeterminado o de un antígeno estrechamente relacionado.

25 El término " $K_D$ " (M), tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno.

30 Tal como se utiliza en la presente memoria, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo IgM o IgG1) que se encuentra codificada por genes de región constante de cadena pesada.

35 Tal como se utiliza en la presente memoria, "intercambio de isotipo" se refiere al fenómeno por el que la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

40 La expresión "de origen natural" tal como se utiliza en la presente memoria aplicada a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, un polipéptido o secuencia polinucleótido que se encuentra presente en un organismo (incluyendo virus), que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada deliberadamente por el hombre en el laboratorio es de origen natural.

45 El término "reorganizado" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a una configuración de un locus de cadena pesada o ligera de inmunoglobulina en el que un segmento V se sitúa inmediatamente contiguo a un segmento D-J ó J en una conformación codificante esencialmente de un dominio VH o VL completo, respectivamente. Puede identificarse un locus génico de inmunoglobulina (anticuerpo) reorganizado mediante comparación con el ADN de línea germinal; un locus reorganizado presentará por lo menos un elemento de homología heptámero/nonámero recombinado.

50 La expresión "no reorganizado" o "configuración de línea germinal" tal como se utiliza en la presente memoria en referencia un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se ha recombinado de manera que sea inmediatamente contiguo a un segmento D o J.

55 La expresión "molécula de ácidos nucleicos", tal como se utiliza en la presente memoria, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácidos nucleicos puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, aunque preferentemente es ADN de doble cadena.

60 Los ácidos nucleicos indicados según la invención preferentemente han sido aislados. La expresión "ácido nucleico aislado" se refiere según la invención a que el ácido nucleico: (i) ha sido amplificado *in vitro*, por ejemplo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) es producido recombinantemente mediante clonación, (iii) ha sido purificado, por ejemplo mediante corte y fraccionamiento mediante electroforesis en gel, o (iv) ha sido sintetizado, por ejemplo mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que se encuentra disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

65 Los ácidos nucleicos pueden, según la invención, encontrarse presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En formas de realización preferidas, un ácido nucleico se

encuentra funcionalmente relacionado con secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas respecto a dicho ácido nucleico. El término "homólogo" se refiere a que un ácido nucleico también se encuentra funcionalmente relacionado con la secuencia de control de la expresión de manera natural y el término "heterólogo" se refiere a que el ácido nucleico no se encuentra funcionalmente relacionado con la secuencia de control de la expresión de manera natural.

Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia de control de la expresión se encuentran "funcionalmente" relacionados entre sí en el caso de que se encuentren unidos covalentemente entre sí de manera que la expresión o transcripción de dicho ácido nucleico se encuentre bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. En el caso de que el ácido nucleico deba traducirse en una proteína funcional, con una secuencia de control de la expresión funcionalmente relacionada con una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia de control de la expresión resulta en la transcripción de dicho ácido nucleico, sin provocar un desplazamiento de marco en la secuencia codificante o sin que dicha secuencia codificante sea incapaz de ser traducida en la proteína o péptido deseado.

La expresión "secuencia de control de la expresión" comprende según la invención promotores, sitios de unión ribosómica, intensificadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En formas de realización particulares de la invención, las secuencias de control de la expresión pueden encontrarse reguladas. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar como función de la especie o tipo celular, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas, las cuales participan en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, secuencia de adición de caperuza y la secuencia CAAT. Más concretamente, las secuencias de control de la expresión 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia de promotor para el control transcripcional del ácido nucleico funcionalmente asociado. Las secuencias de control de la expresión pueden comprender además secuencias intensificadoras o secuencias activadoras cadena arriba.

Según la invención, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácidos nucleicos que se sitúa cadena arriba (5') respecto a la secuencia de ácidos nucleicos que se expresa y que controla la expresión de la secuencia al proporcionar un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios adicionales de reconocimiento y unión para factores adicionales que participan en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Además, un promotor puede ser "inducible" y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutivo" en el caso de que la transcripción no se encuentre controlada por un agente inductor. Un gen que se encuentra bajo el control de un promotor inducible no se expresa, o sólo se expresa en un grado reducido, si el agente inductor se encuentra ausente. En presencia del agente inductor, el gen se activa o se incrementa el nivel de transcripción. Lo anterior se encuentra mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

Entre los promotores que son preferentes según la invención se incluyen los promotores de la polimerasa de SP6, T3 y T7, el promotor del ARN U6 humano, el promotor del CMV y los promotores híbridos artificiales de los mismos (por ejemplo del CMV), en los que se ha fusionado una o más partes con una o más partes de promotores de genes de otras proteínas celulares, tales como, por ejemplo, la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) humana, e incluyendo o no uno o más intrones adicionales.

Según la invención, el término "expresión" se utiliza en su sentido más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo transitoriamente o establemente.

En una forma de realización preferente, una molécula de ácidos nucleicos se encuentra, según la invención, presente en un vector, según resulte apropiado con un promotor, el cual controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se utiliza en la presente memoria en su sentido más general y comprende cualquier vehículo intermediario para el ácido nucleico que permita que dicho ácido nucleico se introduzca, por ejemplo, en células procarióticas y/o eucarióticas y, según resulte apropiado, que se integre en un genoma. Los vectores de este tipo preferentemente se replican y/o expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas víricos. El término "plásmido" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere de manera general a un constructo de material genético extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

Como vector para la expresión de un anticuerpo, puede utilizarse un vector en el que se encuentre la cadena pesada y la cadena ligera de anticuerpo en diferentes vectores, o un tipo de vector en el que la cadena pesada y la cadena ligera se encuentren presentes en el mismo vector.

Las enseñanzas proporcionadas en la presente memoria con respecto a secuencias específicas de ácidos nucleicos y de aminoácidos, por ejemplo las mostradas en el listado de secuencias, deben interpretarse como también referidas a las modificaciones de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo secuencias de aminoácidos que muestran propiedades

idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas y secuencias de ácidos nucleicos codificantes de secuencias de aminoácidos que muestran propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias específicas de ácidos nucleicos. Una importante propiedad es conservar la unión de un anticuerpo a su diana o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo.

5 Preferentemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando sustituye la secuencia específica en un anticuerpo, conserva la unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferentemente las funciones de dicho anticuerpo tal como se indica en la presente memoria, por ejemplo lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.

10 El experto en la materia apreciará que, en particular, las secuencias de la CDR, regiones hipervariables y variables, pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLD18. Por ejemplo, las regiones de la CDR son idénticas o altamente homólogas respecto a las regiones especificadas en la presente memoria. Se contempla que "altamente homólogo" se refiera a 1 a 5, preferentemente 1 a 4, tal como 1 a 3 ó 1 ó 2 sustituciones realizadas en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de manera que muestren homología sustancial con las regiones específicamente dadas a conocer en la presente memoria.

15

Debe apreciarse que los ácidos nucleicos específicos indicados en la presente memoria también incluyen los ácidos nucleicos modificados con el fin de optimizar el uso de los codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias en el uso de los codones entre organismos pueden conducir a una diversidad de problemas referentes a la expresión heteróloga de genes. La optimización de los codones mediante el cambio de uno o más nucleótidos de la secuencia original puede resultar en una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la optimización de la eficacia de la traducción, en un huésped homólogo o heterólogo en el que deba expresarse dicho ácido nucleico. Por ejemplo, en el caso de que deban utilizarse ácidos nucleicos derivados del ser humano y codificantes de regiones constantes y/o regiones de marco de anticuerpos según la presente invención,

20 por ejemplo para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados, puede resultar preferente modificar dichos ácidos nucleicos con el fin de optimizar el uso de los codones, en particular en el caso de que dichos ácidos nucleicos, opcionalmente fusionados con ácidos nucleicos heterólogos, tales como ácidos nucleicos derivados de otros organismos tal como se indica en la presente memoria, deban expresarse en células de un organismo diferente del ser humano, tal como el ratón o el hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos codificantes de regiones constantes de cadena ligera y pesada humana, tales como aquéllas según SEC ID nº 40 y nº 45, respectivamente, pueden modificarse para que incluyan una o más, preferentemente por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y preferentemente hasta 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 ó 100 sustituciones de nucleótidos, resultando en un uso optimizado de los codones, pero no resultando en un cambio de la secuencia de aminoácidos. Dichas sustituciones de nucleótidos preferentemente se refieren a sustituciones de nucleótidos en SEC ID nº 40 y nº 45, respectivamente,

25 seleccionadas de entre las sustituciones mostradas en la alineación siguiente de SEC ID nº 40 y nº 45, respectivamente, con sus contrapartidas modificadas y no resultando en un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada o referida a sustituciones correspondientes en posiciones correspondientes en otras secuencias de ácidos nucleicos codificantes de regiones constantes de cadena ligera y pesada humana, respectivamente. Preferentemente, todas las sustituciones mostradas en las alineaciones siguientes de SEC ID nº 40 y nº 45,

30 respectivamente, con sus contrapartidas modificadas, que no resultan en un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada, se llevan a cabo en secuencias de ácidos nucleicos codificantes de regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas, respectivamente.

35

40





La expresión "similitud de secuencias" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. La expresión "identidad de secuencias" entre dos secuencias polipeptídicas o de ácidos nucleicos indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

5 El "porcentaje de identidad" se obtiene tras una alineación óptica, siendo este porcentaje puramente estadístico, y estando las diferencias entre las dos secuencias distribuidas aleatoriamente y a lo largo de su longitud completa. Las comparaciones entre dos secuencias de nucleótidos o de aminoácidos convencionalmente se llevan a cabo mediante la comparación de estas secuencias tras alinearlas óptimamente, llevando a cabo dicha comparación  
10 segmento por segmento o en una "ventana de comparación", con el fin de identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para la comparación puede alcanzarse, aparte de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, *Ads App. Math.* 2:482, 1981, por medio del algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988, o por medio de  
15 programas informáticos que utilizan dichos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en el paquete Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, dividiendo este número por el número de posiciones que se comparan y multiplicando el resultado  
20 obtenido por 100, de manera que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Pueden llevarse a cabo "sustituciones conservadoras", por ejemplo basándose en las similitudes de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o en la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por  
25 ejemplo, entre los aminoácidos no polares (hidrofóbicos) se incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina, (b) entre los aminoácidos neutros polares se incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina, (c) entre los aminoácidos con carga positiva (básicos) se incluyen arginina, lisina e histidina, y (d) entre los aminoácidos con carga negativa (ácidos) se incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones típicamente pueden llevarse a cabo dentro de los grupos (a) a (d). Además, la glicina y la prolina pueden sustituirse una por otra basándose en su capacidad de interrumpir las hélices  $\alpha$ . Pueden llevarse a  
30 cabo algunas sustituciones preferentes entre los grupos siguientes: (i) S y T, (ii) P y G, e (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el científico experto en la materia podrá construir fácilmente los ADN codificantes de variantes conservadoras de aminoácidos.

La presente invención comprende anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc para  
35 modificar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Estas alteraciones pueden resultar en una reducción o incremento de la unión de C1q y de la CDC o de la unión de Fc $\gamma$ R y de la ADCC. Pueden realizarse sustituciones, por ejemplo, en uno o más residuos aminoácidos de la región constante de cadena pesada, provocando de esta manera una alteración en una función efectora, manteniendo simultáneamente la capacidad de unión al antígeno respecto a la del anticuerpo modificado; ver las patentes US nº 5.624.821 y nº 5.648.260.

La vida media *in vivo* de los anticuerpos puede mejorarse mediante la modificación del epítipo del receptor de  
40 reciclaje del dominio constante de Ig o de un dominio constante similar a Ig, de manera que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región Fc de Ig intacta; ver las patentes US nº 6.121.022 y nº 6.194.551. La vida media *in vivo* puede incrementarse además realizando mutaciones en la región Fc, por ejemplo mediante la sustitución de la treonina por leucina en la posición 252, mediante la sustitución de la treonina por serina en la  
45 posición 254 ó mediante la sustitución de la treonina por fenilalanina en la posición 256; ver la patente US nº 6.277.375.

Además, el patrón de glucosilación de los anticuerpos puede modificarse con el fin de modificar la función efectora  
50 de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añada la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de incrementar la afinidad de la región Fc para los receptores de Fc que, a su vez, resultarán en una ADCC incrementada de los anticuerpos en presencia de células NK; ver Shield *et al.*, *JBC* 277:26733, 2002. Además, puede realizarse una modificación de la galactosilación para modificar la CDC.

55 Alternativamente, en otra forma de realización, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de la totalidad o parte de una secuencia codificante de anticuerpo anti-CDL18, tal como mediante mutagénesis por saturación, y los anticuerpos anti-CDL18 modificados resultantes pueden cribarse para la actividad de unión.

60 La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza en la presente memoria, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichas expresiones pretenden referirse no sólo a la célula sujeto particular, sino también a la progenie de dicha célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones sucesivas debido a mutación o a influencias ambientales, dicha progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula parental aunque todavía se encuentra comprendida dentro del alcance de la expresión "célula huésped" tal como se utiliza en  
65

la presente memoria. Entre las células huésped recombinantes se incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/0 y células linfocíticas.

5 Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" incluye cualquier ser humano o animal no humano. La expresión "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, ovejas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

10 La expresión "animal transgénico" se refiere a un animal que presenta un genoma que comprende uno o más transgenes, preferentemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que preferentemente es capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede presentar un transgén de cadena ligera humana y un transgén de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-CDL18 humanos al inmunizarse con antígeno CLD18 y/o células que expresan CLD18. El transgén de cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, tal como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 ó HCo2, o el transgén de cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, tal como es el caso para los ratones transcromosómicos (por ejemplo KM) descritos en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos de CLD18 (por ejemplo IgG, IgA y/o IgE) al experimentar recombinación V-D-J e intercambio de isotipos.

#### 20 Mecanismo de acción de mAb

Aunque lo siguiente proporciona consideraciones sobre el mecanismo subyacente a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención, no debe considerarse limitativo de la invención en modo alguno.

25 Los anticuerpos indicados en la presente memoria preferentemente interactúan con componentes del sistema inmunológico, preferentemente mediante ADCC o CDC. Los anticuerpos de la invención también pueden utilizarse para dirigirse a cargas diana (por ejemplo isótopos radioactivos, fármacos o toxinas) para eliminar directamente células tumorales, o pueden utilizarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores mediante mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunológicas antitumorales que podrían encontrarse comprometidas debido a los efectos secundarios citotóxicos de la quimioterapia sobre los linfocitos T.

30 Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. La ADCC describe la capacidad de eliminación celular de las células efectoras tal como se indica en la presente memoria, en particular linfocitos, que preferentemente requieren que la célula diana sea marcada por un anticuerpo.

35 La ADCC preferentemente se produce cuando los anticuerpos se unen a antígenos sobre las células tumorales y los dominios Fc de anticuerpo se acoplan a receptores de Fc (FcR) sobre la superficie de las células efectoras inmunológicas. Se han identificado varias familias de receptores de Fc y poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores de Fc definidos. La ADCC puede considerarse un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación de antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas al tumor. Preferentemente, la inducción *in vivo* de la ADCC conduce a respuestas de células T dirigidas a tumor y respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

40 Citotoxicidad dependiente del complemento. La CDC es otro método de eliminación celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también resultan muy efectivos en el direccionamiento de la CDC mediante la ruta clásica de activación del complemento. Preferentemente, en esta cascada, la formación de complejos de antígeno-anticuerpo resulta en el destapado de múltiples sitios de unión de C1q en estrecha proximidad en los dominios CH2 de las moléculas de anticuerpo participantes, tales como moléculas de IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferentemente, dichos sitios de unión de C1q destapados convierten la interacción C1q-IgG previamente de baja afinidad en una de alta avidéz, lo que induce una cascada de sucesos que implica una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferentemente, la cascada del complemento finaliza en la formación de un complejo de ataque membranar, lo que crea poros en la membrana celular, facilitando el paso libre de agua y solutos hacia el interior y el exterior de la célula.

#### 45 Producción de anticuerpos

50 Los anticuerpos de la invención pueden producirse mediante una diversidad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein, Nature 256:495, 1975. Aunque resultan preferentes los procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio pueden utilizarse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo la transformación vírica u oncogénica de linfocitos B o técnicas de expresión fágica utilizando bibliotecas de genes de anticuerpo.

El sistema animal preferente para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. Los protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión son conocidos de la técnica. Las parejas de fusión (por ejemplo las células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión también son conocidos.

Otros sistemas animales preferentes para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son el sistema de la rata y el sistema del conejo (por ejemplo descritos en Spieker-Polet *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92:9348, 1995; ver también Rossi *et al.*, Am. J. Clin. Pathol. 124:295, 2005).

En todavía otra forma de realización preferente, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLD18 pueden generarse utilizando ratones transgénicos o transcromosómicos que portan partes del sistema inmunológico humano y no del sistema del ratón. Entre estos ratones transgénicos y transcromosómicos se incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y colectivamente se denominan en la presente memoria "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en dichos ratones transgénicos puede llevarse a cabo tal como se describe en detalle para CD20 en el documento WO 2004/035607.

Todavía otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes codificantes de anticuerpos a partir de linfocitos productores de anticuerpos de estrategia definida, por ejemplo ver Babcock *et al.*, A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined strategy, 1996. Para más información sobre la ingeniería de anticuerpos recombinantes, ver también Welschof y Kraus, Recombinant antibodies for cancer therapy, ISBN-0-89603-918-8, y Benny K.C. Lo, Antibody Engineering, ISBN 1-58829-092-1.

#### Inmunizaciones

Para generar anticuerpos contra CLD18, pueden inmunizarse ratones con péptidos conjugados con portadores derivados de la secuencia de CDL18, una preparación enriquecida de antígeno CLD18 expresado recombinantemente o fragmentos del mismo y/o células que expresan CLD18, tal como se describe. Alternativamente, pueden inmunizarse ratones con ADN codificante de CLD18 humano de longitud completa (por ejemplo SEC ID nº 1) o fragmentos del mismo, en particular aquellos de SEC ID nº 15, nº 17 y nº 19. En el caso de que las inmunizaciones con una preparación purificada o enriquecida del antígeno CLD18 no resulten en anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CLD18, por ejemplo una línea celular, para inducir respuestas inmunológicas.

Puede realizarse un seguimiento de la respuesta inmunológica durante el curso del protocolo de inmunización, extrayendo muestras de plasma y suero de la vena de la cola o mediante sangrados retroorbitales. Para las fusiones pueden utilizarse ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-CLD18. Los ratones pueden recibir un refuerzo intraperitoneal o intravenoso con células que expresan CLD18 3 días antes del sacrificio y extirpación del bazo para incrementar la tasa de hibridomas secretores de anticuerpos específicos.

#### Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales

Para generar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales contra CLD18, pueden aislarse esplenocitos y células de nódulo linfático a partir de ratones inmunizados y fusionarse con una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. A continuación, los hibridomas resultantes pueden cribarse para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Seguidamente pueden cribarse pocillos individuales mediante ELISA para hibridomas secretores de anticuerpos. Mediante inmunofluorescencia y análisis de FACS con células expresantes, pueden identificarse anticuerpos con especificidad para CLD18. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden sembrarse en placa nuevamente, cribarse nuevamente y, en caso de que todavía sean positivos para los anticuerpos monoclonales anti-CLD18, pueden subclonarse mediante dilución limitante. A continuación, los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo de tejidos para la caracterización.

#### Generación de transfectomas productores de anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica, tales como los que son bien conocidos de la técnica (Morrison S., Science 229:1202, 1985).

Por ejemplo, en una forma de realización, el gen o genes de interés, por ejemplo genes de anticuerpo, pueden ligarse en un vector de expresión, tal como un plásmido de expresión eucariótico, tal como se utiliza mediante el sistema de expresión del gen GS dado a conocer en los documentos WO 87/04462 y 89/01036 y patente EP nº 338 841, u otros sistemas de expresión bien conocidos de la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados puede introducirse en células huésped eucarióticas, tales como células CHO, células NS/0, células

HEK293T o células HEK293, o alternativamente otras células eucarióticas, tales como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método utilizado para introducir estos genes puede ser un método descrito en la técnica, tal como la electroporación, la lipofectina, la lipofectamina u otros. Tras la introducción de estos genes de anticuerpo en las células huésped, pueden identificarse y seleccionarse las células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que seguidamente pueden amplificarse para su nivel de expresión y escalarse para producir anticuerpos. Pueden aislarse y purificarse anticuerpos recombinantes a partir de dichos sobrenadantes y/o células de cultivo. Alternativamente, los genes de anticuerpo clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procarióticas, tales como microorganismos, por ejemplo *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tal como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas; ver, por ejemplo, Verma R. *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 216:165-181, 1998; Pollock *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 231:147-157, 1999; y Fischer R. *et al.*, *Biol. Chem.* 380:825-839, 1999.

#### Utilización de secuencias parciales de anticuerpo para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización)

##### a) Quimerización

Pueden utilizarse anticuerpos monoclonales murinos como anticuerpos terapéuticos en seres humanos al marcarlos con toxinas o isótopos radioactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el ser humano en el caso de que se apliquen repetidamente, conduciendo a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal se encuentra mediada por las regiones constantes de cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el ser humano puede reducirse o evitarse por completo en el caso de que los anticuerpos respectivos se quimericen o humanicen. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos las diferentes partes de los cuales se derivan de diferentes especies animales, tales como los que presentan una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se consigue uniendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo murino con la región constante de las cadenas pesadas y ligeras humanas (por ejemplo tal como describen Kraus *et al.*, en la serie de *Methods in Molecular Biology, Recombinant antibodies for cancer therapy*, ISBN 0-89603-918-8). En una forma de realización preferente, se generan anticuerpos quiméricos mediante la unión de una región constante de cadena ligera kappa humana a una región variable de cadena ligera murina. En una forma de realización también preferente, pueden generarse anticuerpos quiméricos mediante la unión de una región constante de cadena ligera lambda humana a una región variable de cadena ligera murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferentes para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferentes para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

##### b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente mediante residuos aminoácidos que se encuentran situados en las seis regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las cadenas pesadas y ligeras. Por ello, las secuencias de aminoácidos en las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de las CDR son responsables de la mayor parte de las interacciones anticuerpo-antígeno, resulta posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos mediante la construcción de vectores de expresión que incluyen secuencias de CDR procedentes de los anticuerpos naturales específicos injertados en secuencias de marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (ver, por ejemplo, Riechmann L. *et al.*, *Nature* 332:323-327, 1998; Jones P. *et al.*, *Nature* 321:522-525, 1986, y Queen C. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86:10029-10033, 1989). Dichas secuencias de marco pueden obtenerse de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpo de línea germinal. Estas secuencias de línea germinal serán diferentes de las secuencias génicas del anticuerpo maduro porque no incluyen los genes variables completamente ensamblados, los cuales se forman mediante unión V(D)J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de línea germinal también difieren de las secuencias de un anticuerpo de un repertorio secundario de alta afinidad en posiciones individuales uniformemente a lo largo de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la parte aminoterminal de la región marco 1 y en la parte carboxiterminal de la región marco 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por ello, no resulta necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que presente propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (ver el documento WO 99/45962). Las secuencias parciales de cadenas pesadas y ligeras que comprenden las regiones de CDR típicamente resultan suficientes para este fin. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué segmentos génicos variables y de unión de la línea germinal contribuyen a los genes variables del anticuerpo recombinado. A continuación, la secuencia de línea germinal se utiliza para rellenar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de cadenas pesadas y ligeras se cortan durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir las secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse en forma de un conjunto de oligonucleótidos solapantes cortos y combinarse mediante amplificación de PCR para crear un clon completamente sintético de la región variable. Este procedimiento

presenta determinadas ventajas, tales como la eliminación o la inclusión de sitios de restricción particulares, o la optimización de codones particulares.

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadenas pesadas y ligeras procedentes de hibridomas se utilizan para diseñar un conjunto solapante de oligonucleótidos sintéticos para crear secuencias V sintéticas con capacidades codificantes de aminoácidos idénticas a las de las secuencias naturales. Las secuencias de cadena pesada y kappa sintéticas pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: las cadenas de bases nucleotídicas repetidas se encuentran interrumpidas para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; se han incorporado sitios de inicio de traducción óptima según las reglas de Kozak (Kozak, J. Biol. Chem. 266:19867-19870, 1991) y se han insertado sitios HindIII cadena arriba de los sitios de inicio de traducción.

Para las regiones variables tanto de cadenas pesadas como ligeras, las secuencias optimizadas codificantes y no codificantes correspondientes se descomponen en 30 a 50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del oligonucleótido no codificante correspondiente. De esta manera, para cada cadena, los oligonucleótidos pueden ensamblarse en juegos de fragmentos de doble cadena solapantes que abarcan segmentos de 150 a 400 nucleótidos. A continuación, los grupos se utilizan como moldes para producir productos de amplificación por PCR de 150 a 400 nucleótidos. Típicamente se descompone un solo nucleótido de región variable en dos grupos que se amplifican separadamente para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos solapantes seguidamente se combinan mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede resultar deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que puedan clonarse fácilmente en los constructos de vector de expresión.

Las regiones variables de cadenas pesadas y ligeras quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan seguidamente con secuencias clonadas de promotor, líder, inicio de traducción, región constante, 3' no traducida, de poliadenilación y de terminación de transcripción para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadenas pesadas y ligeras pueden combinarse en un único vector, cotransfectados, transfectados en serie o separadamente transfectados en células huésped que seguidamente se fusionan para formar una célula huésped que exprese ambas cadenas. Los plásmidos para la utilización en la construcción de vectores de expresión para la IgGk humana se describen posteriormente. Los plásmidos se construyeron de manera que la PCR amplificase secuencias de ADNc de cadena V pesada y V ligera kappa para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos pueden utilizarse para expresar anticuerpos IgG1 kappa o IgG4 kappa completamente humanos o quiméricos. Pueden construirse plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas ligeras lambda.

De esta manera, en otro aspecto de la invención, se utilizan características estructurales de los anticuerpos anti-CDL18 de la invención para crear anticuerpos anti-CLD18 humanizados y estructuralmente relacionados que conserven por lo menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a CLD18. Más concretamente, pueden combinarse una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón recombinantemente con regiones de marco humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-CLD18 humanizados construidos recombinantemente adicionales de la invención.

#### Unión a células expresantes de antígenos

La capacidad del anticuerpo de unirse a CLD18 puede determinarse utilizando ensayos de unión estándares, tales como los indicados en los ejemplos (por ejemplo ELISA, transferencia western, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo).

#### Caracterización de la unión de anticuerpos

Para purificar anticuerpos anti-CLD18, pueden cultivarse hibridomas seleccionados en matraces de centrifugación de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos anti-CLD18 en biorreactores basados en diálisis. Pueden filtrarse sobrenadantes y, en caso necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida puede comprobarse mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para garantizar la pureza. La solución de tampón puede intercambiarse con PBS, y la concentración puede determinarse a partir de la DO280 utilizando un coeficiente de extinción 1,43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 seleccionados se unen a epítopos únicos, puede utilizarse la mutagénesis dirigida a un sitio o dirigida a múltiple sitios.

#### Determinación de isotipo

Para determinar el isotipo de los anticuerpos purificados, pueden llevarse a cabo los ELISA de isotipo con diversos kits comerciales (por ejemplo Zymed, Roche Diagnostics). Los pocillos de placas de microtitulación pueden

recubrirse con Ig antirratón. Tras el bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. A continuación, los pocillos pueden hacerse reaccionar con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, IgA o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgM de ratón. Tras el lavado, las placas pueden revelarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una DO de 405-650. Alternativamente, puede utilizarse el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, nº de cat. 1493027) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### Análisis de citometría de flujo

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD18, puede utilizarse la citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan CLD18 naturalmente o después de la transfección y los controles negativos que no presentan expresión de CLD18 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándares) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene FBS al 1%, y pueden incubarse a 4°C durante 30 minutos. Tras el lavado, el anticuerpo anti-IgG marcado con APC o con Alexa647 puede unirse a anticuerpo monoclonal con CLD18 unido bajo las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras pueden analizarse mediante citometría de flujo con un instrumento FACS utilizando propiedades de dispersión lumínica y lateral para dejar pasar células vivas individuales. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos de CLD18 de los ligantes no específicos en una sola medición, puede utilizarse el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos codificantes de CLD18 y un marcador fluorescente pueden teñirse tal como se ha indicado anteriormente. Las células transfectadas pueden detectarse en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con anticuerpo. Debido a que la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de CLD18 se unen preferentemente a células que expresan marcadores de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a las células no transfectadas. Puede utilizarse un ensayo alternativo que utiliza microscopía de fluorescencia adicionalmente o alternativamente al ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente tal como se ha indicado anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Las proteínas de unión estrecha tienden a ser internalizadas en el caso de que el contacto célula-célula con células vecinas de células particularmente adherentes se pierda, por ejemplo por desprendimiento de las células. La expresión en superficie celular de CLD18 puede optimizarse mediante: a) el ajuste de las condiciones de cultivo, por ejemplo con el cultivo a una densidad más alta de una manera estandarizada, utilizando un desprendimiento suave (por ejemplo EDTA/PBS 2 mM o acutasa), el procesamiento a temperatura ambiente y la adición de inhibidores de endocitosis (por ejemplo azida sódica) o activadores de la transcripción o traducción de CLD18, y mediante b) la selección y clonación de células que mantienen CLD18 a niveles elevados en la superficie celular, por ejemplo mediante selección con antibióticos en términos de células transfectadas, mediante inmunomagnetismo o separación celular por FACS y por clonación mediante dilución limitante.

#### Microscopía de inmunofluorescencia

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD18 puede utilizarse el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, se cultivan líneas celulares que expresan espontáneamente o tras la transfección, CLD18 y controles negativos que no presentan expresión de CLD18, en portaobjetos con cámara bajo condiciones de crecimiento estándares en medio DMEM/F12, suplementado con suero de feto bovino al 10% (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 IU/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. A continuación, las células pueden fijarse con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Las células seguidamente pueden hacerse reaccionar con anticuerpos monoclonales contra CLD18 durante 30 minutos a 25 °C. Tras el lavado, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) bajo las mismas condiciones. A continuación, las células pueden examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Los niveles totales de CLD18 en las células pueden observarse tras fijar las células con metanol o paraformaldehído y permeabilizarlas con Triton X-100. En células vivas y no permeabilizadas, puede examinarse la localización en superficie de CLD18 en células fijadas con paraformaldehído. Además, puede analizarse el direccionamiento de CLD18 a uniones estrechas mediante la cotinción con marcadores de unión estrecha tales como ZO-1. Además, pueden examinarse los efectos de la unión de anticuerpos y la localización de CLD18 dentro de la membrana celular.

#### Transferencia western

La IgG anti-CLD18 puede someterse a ensayo adicionalmente para reactividad con el antígeno CLD18 mediante transferencia western. Brevemente, pueden prepararse extractos celulares procedentes de células que expresan CLD18 y controles negativos apropiados y someterse a electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico (SDS)-poliacrilamida. Tras la electroforesis, los antígenos separados se transfieren a membranas de nitrocelulosa, se

bloquean y se sondan con los anticuerpos monoclonales que deben someterse a ensayo. La unión de IgG puede detectarse utilizando anticuerpo anti-IgG de ratón-peroxidasa y revelarse con sustrato ECL.

#### Inmunohistoquímica

5 Pueden someterse a ensayo adicionalmente las IgG anti-CLD18 de ratón para reactividad con el antígeno CLD18 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por el experto en la materia, por ejemplo utilizando  
10 criosecciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido incluidas en parafina fijadas con paraformaldehído procedentes de muestras de tejido no canceroso o canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos rutinarios o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas  
15 celulares que expresan espontáneamente (por ejemplo DAN-G, SNU-16 ó KATO-III) o tras la transfección (por ejemplo HEK293) CLD18. Para la inmunotinción, pueden incubarse anticuerpos reactivos con CLD18, seguido de anticuerpos de cabra antirratón y de cabra anticonejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) siguiendo las instrucciones del proveedor.

#### Actividades fagocítica y de eliminación celular de los anticuerpos *in vitro*

Además de la unión específica a CLD18, pueden someterse a ensayo anticuerpos anti-CLD18 para su capacidad de  
20 mediar en la fagocitosis y eliminación de células que expresan CLD18. Para el ensayo de la actividad *in vitro* de anticuerpos monoclonales, los presentes inventores proporcionan un cribado inicial previamente al ensayo de modelos *in vivo*.

#### *Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):*

25 Brevemente, pueden purificarse células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, procedentes de donantes sanos, mediante centrifugación de densidad en Ficoll-Hypaque, seguido de la lisis de los eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI  
30 suplementado con suero de feto bovino al 10% inactivado por calor o, alternativamente, con suero humano al 5% inactivado por calor y mezclado con células diana marcadas con <sup>51</sup>Cr que expresan CLD18, a diversas proporciones de células efectoras a células diana. Alternativamente, las células diana pueden marcarse con un ligando  
35 intensificador de la fluorescencia (BATDA). Puede medirse con un fluorímetro un quelato altamente fluorescente del europio con el ligando intensificador, el cual resulta liberado de las células muertas. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de las células diana con luciferasa. A continuación, el amarillo lucifer añadido puede ser oxidado por las células viables únicamente. Seguidamente las IgG anti-CLD18 purificadas pueden añadirse a  
40 diversas concentraciones. Puede utilizarse IgG humano irrelevante a modo de control negativo. Pueden llevarse a cabo ensayos durante 4 a 20 horas a 37°C dependiendo del tipo de célula efectora utilizado. Pueden someterse a ensayo muestras para citólisis mediante la medición de la liberación del <sup>51</sup>Cr o la presencia del quelato EuTDA en el sobrenadante de cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida del número de células viables.

40 Los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 también pueden someterse a ensayo en diversas combinaciones para determinar si la citólisis resulta incrementada con múltiples anticuerpos monoclonales.

#### *Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):*

45 Los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 pueden someterse a ensayo para su capacidad de mediar en la CDC utilizando una diversidad de técnicas conocidas. Por ejemplo, puede obtenerse suero para el complemento de sangre de una manera conocida por el experto en la materia. Para determinar la actividad de CDC de los mAb,  
50 pueden utilizarse diferentes métodos. Por ejemplo puede medirse la liberación de <sup>51</sup>Cr o puede evaluarse una permeabilidad membranal elevada utilizando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (YP). Brevemente, las células diana pueden lavarse y pueden incubarse 5x10<sup>5</sup> células/ml con diversas concentraciones de mAb durante 10 a 30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. A continuación, puede añadirse suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células incubarse a 37°C durante 20 a 30 minutos. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a la solución de YP en un tubo para FACS. La mezcla seguidamente puede analizarse  
55 inmediatamente mediante análisis de citometría de flujo utilizando FACSArray.

En un ensayo alternativo, puede determinarse la inducción de la CDC sobre las células adherentes. En una forma de  
60 realización de este ensayo, se siembran las células 24 horas antes del ensayo con una densidad de 3x10<sup>4</sup> células/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano para cultivo de tejidos. Al día siguiente, se extrae el medio y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o con medio de crecimiento que contiene saponina al 0,2% para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Tras la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, se extrajo el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% (v/v) o suero en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubaron durante 20 minutos más a 37°C. Todas las células de cada muestra se añadieron a solución de yoduro de propidio (10 µg/ml). A  
65 continuación, se sustituyeron los sobrenadantes por PBS que contenía 2,5 µg/ml de bromuro de etidio y se midió a 600 nm la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm, utilizando un aparato Tecan Safire. Se calculó el

porcentaje de lisis específica de la manera siguiente: % de lisis específica = (fluorescencia de la muestra - fluorescencia de fondo) / (fluorescencia de la lisis máxima - fluorescencia de fondo) x 100.

#### Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

5 Para someter a ensayo la capacidad de iniciar la apoptosis, pueden incubarse anticuerpos monoclonales anti-CLD18, por ejemplo con células tumorales positivas para CLD18, por ejemplo SNU-16, DAN-G, KATO-III o células tumorales transfectadas con CLD18, a 37°C durante aproximadamente 20 horas. Las células pueden recolectarse, lavarse en tampón de unión de anexina-V (BD Biosciences), e incubarse con anexina-V conjugada con FITC o APC (BD Biosciences) durante 15 minutos en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden añadirse a solución de YP (10 µg/ml en PBS) en un tubo de FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (tal como anteriormente). Alternativamente, puede detectarse una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales utilizando kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, nº de cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis del ADN de las células proliferantes en microplacas. El BrdU incorporado se detecta utilizando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de los anticuerpos, se fijan las células y el ADN se desnaturaliza utilizando solución de fijación. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado y se añade inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado hacia la solución, en donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida (utilizando fluorimetría resuelta temporalmente en la detección) es proporcional a la síntesis de ADN en las células de cada pocillo.

#### Estudios preclínicos

25 Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLD18 también pueden someterse a ensayo en un modelo *in vivo* (por ejemplo en ratones inmunológicamente deficientes portadores de tumores xenoinjertados, en los que se han inoculado líneas celulares que expresan CLD18, por ejemplo DAN-G, SNU-16 ó KATO-III, o después de la transfección, por ejemplo HEK293) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de las células tumorales que expresan CLD18.

30 Pueden llevarse a cabo estudios *in vivo* tras xenoinjertar células tumorales que expresan CLD18 en ratones inmunocomprometidos u otros animales utilizando anticuerpos de la invención. Pueden administrarse anticuerpos en ratones sin tumor seguido de la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos en la prevención de la formación de tumores o de síntomas relacionados con tumores. Los anticuerpos pueden administrarse en ratones portadores tumorales con el fin de determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos en la reducción del crecimiento tumoral, la metástasis o síntomas relacionados con tumores. La aplicación de anticuerpos puede combinarse con la aplicación de otras sustancias, tales como fármacos citostáticos, inhibidores de factor de crecimiento, bloqueantes del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la potencial toxicidad de las combinaciones. Con el fin de analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por anticuerpos de la invención, los animales pueden inocularse con anticuerpos o reactivos de control e investigarse a fondo para síntomas posiblemente relacionados con la terapia de anticuerpos de CLD18. Entre los posibles efectos secundarios de la aplicación *in vivo* de anticuerpos de CLD18 se incluyen en particular la toxicidad en los tejidos que expresan CLD18, incluyendo el estómago y el pulmón. Los anticuerpos que reconocen CLD18 en el ser humano y en otras especies, por ejemplo el ratón, resultan particularmente útiles para predecir los potenciales efectos secundarios mediados por la aplicación de los anticuerpos monoclonales de CLD18 en el ser humano.

#### Mapeado de epítomos

50 El mapeado de epítomos reconocidos por los anticuerpos de la invención puede llevarse a cabo tal como se describe en detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)" de Glenn E. Morris, ISBN-089603-375-9 y en "Epitope Mapping: A Practical Approach", Practical Approach Series, 248, de Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay.

#### I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CLD18

En todavía otra forma de realización de la invención, los anticuerpos de CLD18 pueden derivatizarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo otro péptido o proteína (por ejemplo un fragmento Fab') con el fin de generar una molécula biespecífica o multiespecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítomos diana. Por ejemplo, un anticuerpo de la invención puede unirse funcionalmente (por ejemplo mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente u otro modo) a otra u otras moléculas de unión, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

65 De acuerdo con lo anteriormente expuesto, la presente invención incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que comprenden por lo menos una primera especificidad de unión para CLD18 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítomo diana. En una forma de realización particular de la invención, el segundo epítomo

diana es un receptor de Fc, por ejemplo Fc- $\gamma$ RI humano (CD64) o un receptor de Fc- $\alpha$  (CD89) o un receptor de célula T, por ejemplo CD3. Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas capaces de unirse a células efectoras expresantes de Fc- $\gamma$ R, Fc- $\alpha$ R o Fc- $\epsilon$ R (por ejemplo monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)) y a células diana que expresan CLD18. Estas moléculas biespecíficas o multiespecíficas pueden dirigir las células expresantes de CLD18 a células efectoras y pueden inducir actividades de célula efectora mediadas por receptores de Fc, tales como la fagocitosis de las células expresantes de CLD18, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la liberación de citocinas o la generación de anión superóxido.

Entre las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención pueden incluirse además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de anti-unión de Fc y una especificidad anti-unión de CLD18. En una forma de realización, la tercera especificidad de unión es una porción anti-factor de intensificación (FI), por ejemplo una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y que de esta manera incrementa la respuesta inmunológica contra la célula diana. La "porción anti-factor de intensificación" puede ser un anticuerpo, fragmento funcional de anticuerpo o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo un antígeno o un receptor, y que de esta manera resulta en una intensificación del efecto de los determinantes de unión para el receptor de Fc o el antígeno de la célula diana. La "porción anti-factor de intensificación" puede unirse a un receptor de Fc o a un antígeno de la célula diana. Alternativamente, la porción anti-factor de intensificación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen la primera y segunda especificidades de unión. Por ejemplo, una porción anti-factor de intensificación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo mediante CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunológica que resulte en una respuesta inmunológica incrementada contra la célula diana).

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención comprenden como especificidad de unión por lo menos un anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> o un Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadenas ligeras o de cadenas pesadas, o cualquier fragmento mínimo del mismo, tal como un Fc o un constructo de cadena sencilla, tal como se describe en Ladner *et al.*, patente US nº 4.946.778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina, tal como se da a conocer en los documentos US 2003/0118592 y 2003/0133939.

En una forma de realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención comprenden una especificidad de unión para un Fc- $\gamma$ R o un Fc- $\alpha$ R presente sobre la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión para un antígeno de la célula diana, por ejemplo CLD18.

En una forma de realización, un anticuerpo monoclonal proporciona la especificidad de unión para un receptor de Fc, la unión del cual no resulta bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena  $\gamma$  situados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembranal o soluble, los cuales se agrupan en tres clases de receptor de Fc $\gamma$ : Fc- $\gamma$ RI (CD64), Fc- $\gamma$ RII (CD32) y Fc- $\gamma$ RIII (CD16). En una forma de realización preferente, el receptor de Fc $\gamma$  es un Fc- $\gamma$ RI de alta afinidad humano.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferentes se describen en Fanger *et al.*, en el documento WO 88/00052 y en la patente US nº 4.954.617. Estos anticuerpos se unen a un epítipo de Fc- $\gamma$ RI, Fc- $\gamma$ RII o Fc- $\gamma$ RIII en un sitio que es diferente del sitio de unión de Fc $\gamma$  del receptor y, de esta manera, su unión no resulta bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Son anticuerpos anti-Fc $\gamma$ RI específicos que resultan útiles en la presente invención, mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras formas de realización, el anticuerpo anti-receptor de Fc $\gamma$  es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano R.F. *et al.*, J. Immunol. 155(10):4996-5002, 1995 y en el documento WO nº 94/10332. La línea celular productora de anticuerpo H22 se ha depositó en la American Type Culture Collection el 4 de noviembre de 1992 bajo la designación HA022CL1 y presenta el nº de acceso CRL 11177.

En todavía otras formas de realización preferidas, la especificidad de unión para un receptor de Fc la proporciona un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo un receptor de Fc- $\alpha$  (Fc- $\alpha$ RI (CD89)), la unión del cual preferentemente no resulta bloqueada por la inmunoglobulina A (IgA) humana. La expresión "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen  $\alpha$  (Fc- $\alpha$ RI) situado en el cromosoma 19. Este gen es codificado que codifica varias isoformas transmembranales alternativamente procesadas de 55 a 110 kDa. Fc- $\alpha$ RI (CD89) se expresa constitutivamente sobre monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no sobre poblaciones celulares no efectoras. Fc- $\alpha$ RI presenta una afinidad intermedia tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa con la exposición a citocinas, tales como G-CSF o GM-CSF (Morton H.C. *et al.*, Critical Reviews in Immunology 16:423-440, 1996). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos para Fc- $\alpha$ RI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc- $\alpha$ RI fuera del dominio de unión de ligando de IgA (Monteiro R.C. *et al.*, J. Immunol. 148:1764, 1992).

Fc- $\alpha$ RI y Fc- $\gamma$ RI son receptores de inducción preferentes para la utilización en la invención debido a que: (1) se expresan principalmente sobre las células efectoras inmunológicas, por ejemplo monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas, (2) se expresan a niveles elevados (por ejemplo 5.000 a 100.000 en cada célula), (3) son

mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo la ADCC y la fagocitosis), (4) median en la presentación incrementada de antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

5 En otra forma de realización, la molécula biespecífica comprende dos anticuerpos monoclonales según la invención que presentan actividades funcionales complementarias, de manera que un anticuerpo funciona predominantemente induciendo CDC y el otro anticuerpo funciona predominantemente induciendo apoptosis.

10 La expresión "anticuerpo específico de célula efectora" tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a un anticuerpo o fragmento funcional de anticuerpo que se une al receptor de Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferentes para la utilización en la presente invención se unen a receptores de Fc de las células efectoras en un sitio al que no se unen las inmunoglobulinas endógenas.

15 Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "célula efectora" se refiere a una célula inmunológica que participa en la etapa efectora de una respuesta inmunológica, y no en las etapas cognitiva y de activación de una respuesta inmunológica. Entre las células inmunológicas ejemplares se incluyen las células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo linfocitos (por ejemplo células B y células T, incluyendo células T citotóxicas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos). Algunas células efectoras expresan receptores de Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunológicas específicas. En formas de realización preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, los macrófagos, los cuales expresan FcR, participan en la eliminación específica de las células diana y presentan antígenos a otros componentes del sistema inmunológico, o la unión a células que presentan antígenos. En otras formas de realización, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, una célula diana o un microorganismo. La expresión de un FcR particular sobre una célula efectora puede encontrarse regulada por factores humorales tales como citocinas. Por ejemplo, la expresión de Fc- $\gamma$ RI se ha encontrado que resulta regulada positivamente por el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Esta expresión intensificada incrementa la actividad citotóxica de las células portadoras de Fc- $\gamma$ RI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o lisar un antígeno diana o una célula diana.

25 30 La expresión "célula diana" se refiere a cualquier célula no deseable en un sujeto (por ejemplo un ser humano o animal) que puede ser la diana de un anticuerpo de la invención. En formas de realización preferidas, la célula diana es una célula que expresa o sobreexpresa CLD18. Entre las células que expresan CLD18 típicamente se incluyen las células tumorales.

35 Pueden prepararse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención utilizando técnicas químicas (ver, por ejemplo, D.M. Kranz *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807, 1981), técnicas de "polidoma" (ver la patente US n° 4.474.893, de Reading) o técnicas de ADN recombinante.

40 En particular, pueden prepararse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente invención mediante la conjugación de especificidades de unión constituyentes, por ejemplo las especificidades de unión anti-FcR y anti-CLD18 utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas puede generarse por separado y después conjugarse con otras. En el caso de que las especificidades de unión sean proteínas o péptidos, puede utilizarse una diversidad de agentes de acoplamiento o de entrecruzamiento para la conjugación covalente. Entre los ejemplos de agentes de entrecruzamiento se incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexán-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver, por ejemplo, Karpovsky *et al.*, J. Exp. Med. 160:1686, 1984; Liu M.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648, 1985). Entre otros métodos se incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. 78:118-132, 1985), Brennan *et al.* (Science 229:81-83, 1985) y Glennie *et al.* (J. Immunol. 139:2367-2375, 1987). Son agentes de conjugación preferentes, SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

55 En el caso de que las especificidades de unión sean anticuerpos, pueden conjugarse mediante enlaces sulfhidrido de las regiones bisagra C-terminales de las dos cadenas pesadas. En una forma de realización particularmente preferente, la región bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos sulfhidrido, preferentemente uno, previamente a la conjugación.

60 Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden encontrarse codificadas en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método resulta particularmente útil en el caso de que la molécula biespecífica y multiespecífica sea una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')<sub>2</sub> o ligando x Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la invención, por ejemplo una molécula biespecífica, puede ser una molécula de cadena sencilla, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender por lo menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas biespecíficas y multiespecíficas se describen

en, por ejemplo, las patentes US nº 5.260.203, nº 5.455.030, nº 4.881.175, nº 5.132.405, nº 5.091.513, nº 5.476.786, nº 5.013.653, nº 5.258.498 y nº 5.482.858.

5 La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus dianas específicas puede confirmarse mediante  
 10 ensayo de inmunosorción ligada a enzima (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis de FACS, un bioensayo  
 (por ejemplo de inhibición del crecimiento) o un ensayo de transferencia western. Cada uno de estos ensayos  
 generalmente detecta la presencia de complejos de proteína-anticuerpo de interés particular mediante la utilización  
 15 de un reactivo marcado (por ejemplo un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, pueden  
 detectarse complejos FcR-anticuerpo utilizando, por ejemplo, un anticuerpo unido a enzima o un fragmento de  
 anticuerpo que reconoce y se une específicamente a los complejos de anticuerpo-FcR. Alternativamente, los  
 complejos pueden detectarse utilizando cualquiera de entre una diversidad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el  
 anticuerpo puede marcarse radioactivamente y utilizarse en un radioinmunoensayo (RIA) (ver, por ejemplo,  
 Weintraub B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The  
 Endocrine Society, marzo de 1986). El isótopo radioactivo puede detectarse mediante medios tales como la  
 utilización de un contador y o un contador de centelleo o mediante autorradiografía.

## II. Inmunoconjugados

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-CLD18 conjugado con una fracción o agente  
 terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo un inmunosupresor) o un isótopo radioactivo. Dichos  
 conjugados se denominan en la presente memoria "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o  
 más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que  
 25 resulte perjudicial para las células y, en particular, que las mate. Entre los ejemplos se incluyen taxol, citocalasina B,  
 gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina,  
 doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi-antracina-diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-  
 deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propanolol y puomicina y análogos u  
 homólogos de los mismos.

30 Entre los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunoconjugados de la invención se incluyen, aunque sin  
 limitación, antimetabolitos (por ejemplo metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-  
 fluorouracil-decarbazona), agentes alquilantes (por ejemplo mecloretamina, tiotepa, clorambucilo, melfalán,  
 carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y  
 35 cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo daunorrubicina (anteriormente  
 daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina,  
 mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimitóticos (por ejemplo vincristina y vinblastina). En una forma de  
 realización preferente, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra forma de  
 realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En todavía otra forma de realización, el agente terapéutico  
 es GM-CSF. En una forma de realización preferente, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina,  
 sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina-A.

40 Los anticuerpos de la presente invención también pueden conjugarse con un isótopo radioactivo, por ejemplo yodo-  
 131, itrio-90 ó indio-111, para generar radiofarmacéuticos citotóxicos para el tratamiento de un trastorno relacionado  
 con CLD18, tal como un cáncer. Los conjugados de anticuerpo de la invención pueden utilizarse para modificar una  
 45 respuesta biológica dada, y la fracción fármaco no debe interpretarse como limitada a los agentes terapéuticos  
 químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción fármaco puede ser una proteína o polipéptido que presente una actividad  
 biológica deseada. Entre dichas proteínas pueden incluirse, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa o  
 fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas* o toxina diftérica; una proteína,  
 tal como el factor de necrosis tumoral o el interferón- $\gamma$  o modificadores de la respuesta biológica, tales como, por  
 50 ejemplo, linfoquinas, interleuquina-1 ("IL-1"), interleuquina-2 ("IL-2"), interleuquina-6 ("IL-6"), factor estimulantes de  
 colonias de granulocitos-macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros  
 factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas; ver, por ejemplo, Amon *et*  
 55 *al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en: Monoclonal Antibodies And  
 Cancer Therapy, Reisfeld *et al.* (editores), páginas 243 a 256 (Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies  
 For Drug Delivery", en: Controlled Drug Delivery (2a edición), Robinson *et al.* (editores), páginas 623 a 653 (Marcel  
 Dekker, Inc., 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en: Monoclonal  
 60 Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (editores), páginas 475 a 506, 1985; "Analysis,  
 Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en:  
 Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin *et al.* (editores), páginas 303 a 316 (Academic  
 Press, 1985) y Thorpe *et al.*, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol.  
 Rev. 62:119-58, 1982.

En una forma de realización adicional, los anticuerpos según la invención se unen a un conector-quelante, por  
 65 ejemplo tiuxetano, que permite que el anticuerpo se conjugue con un isótopo radioactivo.

III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente invención proporciona una composición, por ejemplo una composición farmacéutica, que contiene un anticuerpo o una combinación de anticuerpos de la presente invención. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con otros adyuvantes y excipientes conocidos según técnicas convencionales, tales como las dadas a conocer en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19a edición, Gennaro, editor, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En una forma de realización, entre las composiciones se incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo dos o más) anticuerpos aislados de la invención que actúan mediante mecanismos diferentes, por ejemplo un anticuerpo que actúa predominantemente mediante la inducción de CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente mediante la inducción de apoptosis.

Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden administrarse en terapia de combinación, es decir, en combinación con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición de la presente invención con por lo menos un agente antiinflamatorio o por lo menos un agente inmunosupresor. En una forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un NSAID (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Entre los agentes preferentes se incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), NSAID tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenac (Voltaren), piroxicam (Feldene), cetoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro) e indometacina (Indocin).

En otra forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen agentes que conducen al agotamiento o inactivación funcional de las células T reguladoras, tales como dosis bajas de ciclofosfamida, anticuerpos anti-CTLA4, o anticuerpos anti-IL2 o anti-receptor de IL-2.

En todavía otra forma de realización, entre dichos agentes terapéuticos se incluyen uno o más quimioterapéuticos, tales como derivados de taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina (adriamicina), cisplatino (platinol), ciclofosfamida (Cytosan, Procytox, Neosar). En otra forma de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden administrarse en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferentemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que sufren de cáncer de estómago, esofágico, pancreático y pulmonar.

En todavía otra forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden administrarse conjuntamente con radioterapia y/o células madre periféricas autólogas o trasplante de médula ósea.

En todavía otra forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de entre anticuerpos anti-CD25, anti-EPCAM, anti-EGFR, anti-Her2/neu y anti-CD40.

En todavía una forma de realización adicional, los anticuerpos de la invención pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-C3b(i) con el fin de incrementar la activación del complemento.

Tal como se utiliza en la presente memoria, la expresión "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción que son fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el portador resulta adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, puede recubrirse en un material para proteger el compuesto frente a la acción de ácidos y otras condiciones naturales que podrían inactivar el compuesto.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del compuesto parental y no produce ningún efecto toxicológico no deseado (ver, por ejemplo, Berge S.M. *et al.*, J. Pharm. Sci. 66:1-19, 1977).

Entre los ejemplos de dichas sales se incluyen las sales de adición de ácido y las sales de adición de base. Entre las sales de adición de ácido se incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como los ácidos hidrocórico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, hidrobromico, hidroyódico y fosforoso, así como de ácidos orgánicos no tóxicos, tales como ácidos monocarboxílicos y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos con sustitución del fenol, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Entre las sales de adición de ácidos se incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio y calcio, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletildiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina y procaína.

Una composición de la presente invención pueden administrarse mediante una diversidad de métodos conocidos de la técnica. Tal como apreciará el experto en la materia, la vía y/o modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con portadores que protegerán el compuesto

frente a la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden utilizarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos de preparación de dichas formulaciones son generalmente conocidos por el experto en la materia. Ver, por ejemplo, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, editor, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Con el fin de administrar un compuesto de la invención mediante determinadas vías de administración puede resultar necesario recubrir el compuesto un material que impida su inactivación, o coadministrar el compuesto con dicho material. Por ejemplo, el compuesto puede administrarse en un sujeto en un portador apropiado, por ejemplo liposomas, o un diluyente. Entre los diluyentes farmacéuticamente aceptables se incluyen solución salina y soluciones tampón acuosas. Entre los liposomas se incluyen emulsiones CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan *et al.*, *J. Neuroimmunol.* 7:27, 1984).

Entre los portadores farmacéuticamente aceptables se incluyen las soluciones o dispersiones acuosas estériles y los polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La utilización de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocida en la técnica. Excepto en la medida que cualquier medio o agente convencional resulte incompatible con el compuesto activo, se encuentra contemplada la utilización del mismo en las composiciones farmacéuticas de la invención. También pueden incorporarse compuestos activos suplementarios en las composiciones.

Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse en forma de una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada que resulte adecuada para una concentración elevada de fármaco. El portador puede ser un solvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse mediante, por ejemplo, la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos, resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede generarse mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo sales monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes indicado anteriormente, según resulte necesario, seguido de la esterilización mediante microfiltración.

Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los demás ingredientes requeridos de entre los indicados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferentes de preparación son el secado al vacío y el secado mediante congelación (liofilización), los cuales rinden unos polvos del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución del mismo previamente esterilizada mediante filtración.

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas en el tiempo o la dosis puede reducirse o incrementarse proporcionalmente según dicten las exigencias de la situación terapéutica. Resulta especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de las dosis. La forma de dosificación unitaria tal como se utiliza en la presente memoria se refiere a unidades físicamente discretas que resultan adecuadas como dosis unitarias para los sujetos que deben tratarse; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención está dictada y es directamente dependiente de: (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe conseguirse, y (b) las limitaciones inherentes a la técnica de preparación de dicho compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Entre los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables se incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico y sulfito sódico, (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo y  $\alpha$ -tocoferol, y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina-tetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico y ácido fosfórico.

Para las composiciones terapéuticas, entre las formulaciones de la presente invención se incluyen las adecuadas para la administración oral, nasal, tópica (incluyendo bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones pueden presentarse convenientemente en forma de dosificación unitaria y pueden prepararse mediante cualesquiera métodos conocidos de la técnica farmacéutica. La cantidad de principio activo que puede

combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual variará dependiendo del sujeto bajo tratamiento y el modo particular de administración. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material portador para producir una forma de dosificación individual generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico.

5 Generalmente, en porcentaje, dicha cantidad se encuentra comprendida entre aproximadamente 0,01 y aproximadamente noventa y nueve por ciento del principio activo, preferentemente entre aproximadamente 0,1 por ciento y aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente entre aproximadamente 1 por ciento y aproximadamente 30 por ciento.

10 Las formulaciones de la presente invención que resultan adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en spray que contienen dichos portadores, tal como es conocido de la técnica que resulta apropiado. Entre las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de composiciones de la presente invención se incluyen polvos, sprays, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo puede mezclarse bajo condiciones estériles con un portador farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que resulten necesarios.

15 Las expresiones "administración parenteral" y "administrado parenteralmente" tal como se utilizan en la presente memoria se refieren a modos de administración diferentes de las administraciones entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, aunque sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

20 Entre los ejemplos de portadores acuosos y no acuosos adecuados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas de la invención se incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la utilización de materiales de recubrimiento, tales como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante la utilización de surfactantes.

25 Dichas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse mediante procedimientos de esterilización y mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabén, clorobutanol y ácido fenolsórbico. También puede resultar deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares y cloruro sódico en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

30 En una forma de realización, los anticuerpos monoclonales de la invención se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea; ver Yang *et al.*, PNAS 100(12):6934-6939, 2003. En el caso de que los compuestos de la presente invención se administren como farmacéuticos, en seres humanos y en animales, pueden proporcionarse solos o en forma de una composición farmacéutica que contenga, por ejemplo, 0,01% a 99,5% (más preferentemente 0,1% a 90%) de principio activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable.

35 Con independencia de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, los cuales pueden utilizarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables mediante métodos convencionales conocidos por el experto en la materia.

40 Los niveles de dosis reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden modificarse de manera que se obtenga una cantidad del principio activo que resulte efectiva para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin que resulte tóxica para el paciente. El nivel de dosis seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos, entre ellos la actividad de las composiciones particulares de la presente invención utilizadas, de la vía de administración, del tiempo de administración, de la tasa de excreción del compuesto particular utilizado, de la duración del tratamiento, de otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares usadas, de la edad, sexo, peso, estado general de salud e historia médica previa del paciente bajo tratamiento y de factores similares bien conocidos de la medicina.

45 Un médico o veterinario experto en la materia podrá determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar el tratamiento con dosis de los compuestos de la invención utilizadas en la composición farmacéutica a niveles más bajos que los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado y gradualmente incrementar la dosis hasta alcanzar el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis efectiva mínima necesaria para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva generalmente

5 dependerá de los factores indicados anteriormente. Resulta preferente que la administración sea por vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferentemente administrada en un sitio próximo al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria efectiva de una composición terapéutica puede administrarse en forma de dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas separadamente a intervalos apropiados durante el día, opcionalmente en formas de dosificación unitaria. Aunque resulta posible la administración de un compuesto de la presente invención por sí solo, resulta preferible administrar el compuesto en forma de una formulación (composición) farmacéutica.

10 En una forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden administrarse mediante infusión, preferentemente mediante infusión continua lenta durante un periodo prolongado, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración también puede llevarse a cabo mediante infusión continua durante un periodo de entre 2 y 24 horas, tal como entre 2 y 12 horas. Dicho régimen puede repetirse una o más veces según resulte necesario, por ejemplo tras 6 ó 12 meses. La dosis puede determinarse o ajustarse mediante la medición de la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-CDL18 circulantes tras la administración en una muestra biológica mediante la utilización de anticuerpos antiidiotípicos con diana en los anticuerpos anti-CLD18.

15 En todavía otra forma de realización, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un periodo de 6 ó más meses.

20 En todavía otra forma de realización, los anticuerpos según la invención pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra CLD18 seguido de una infusión de un anticuerpo contra CLD18 conjugado con un isótopo radioactivo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, 7 a 9 días después.

25 Pueden administrarse composiciones terapéuticas con dispositivos médicos conocidos de la técnica. Por ejemplo, en una forma de realización preferente, puede administrarse una composición terapéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos dados a conocer en las patentes US n 5.399.163, n° 5.383.851, n° 5.312.335, n° 5.064.413, n° 4.941.880, n° 4.790.824 ó n° 4.596.556. Entre los ejemplos de implantes y módulos bien conocidos que resultan útiles en la presente invención se incluyen los descritos en la patente US n° 4.487.603, que da a conocer una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una tasa controlada; la patente US n° 4.486.194, que da a conocer un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente US n° 4.447.233, que da a conocer una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una tasa de infusión exacta; la patente US n° 4.447.224 que da a conocer un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente US n° 4.439.196, que da a conocer un sistema osmótico de administración de fármacos que presenta compartimientos multicámara, y la patente US n° 4.475.196, que da a conocer un sistema osmótico de administración de fármaco.

35 Muchos otros de entre dichos implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por el experto en la materia. En determinadas formas de realización, los anticuerpos de la invención pueden formularse para garantizar la distribución correcta *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematocefálica (BHC) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para garantizar que los compuestos terapéuticos de la invención cruzan la BHC (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para los métodos de preparación de liposomas ver, por ejemplo, las patentes US n° 4.522.811, n° 5.374.548 y n° 5.399.33. Los liposomas pueden comprender una o más fracciones que son transportadas selectivamente al interior de células u órganos específicos y de esta manera incrementar la administración dirigida de fármacos (ver, por ejemplo, V.V. Ranade, J. Clin. Pharmacol. 29:685, 1989). Entre las fracciones diana ejemplares se incluyen el folato o la biotina (ver, por ejemplo, la patente US n° 5.416.016, de Low *et al.*), los manósidos (Umezawa *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038, 1988), los anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.*, FEBS Lett. 357:140, 1995; M. Owais *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 39:180, 1995) y el receptor de proteína A surfactante (Briscoe *et al.*, Am. J. Physiol. 1233:134, 1995).

40 En una forma de realización de la invención, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas. En una forma de realización más preferente, los liposomas incluyen una fracción diana. En una forma de realización más preferente, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran mediante inyección de bolo en un sitio próximo al área deseada, por ejemplo el sitio de un tumor. La composición debe ser líquida en el grado de que haya una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

45 En una forma de realización adicional, los anticuerpos de la invención pueden formularse para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto puede llevarse a cabo mediante métodos conocidos en la técnica, pro ejemplo mediante PEGilación de los anticuerpos o mediante la utilización de fragmentos F(ab)<sub>2</sub>.

50 Pueden obtenerse referencias adicionales en "Cunningham-Rundles C., Zhuo Z., Griffith B., Keenan J., Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation", J. Immunol. Methods 152:177-190, 1992, y en Landor M., Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74:279-283, 1995.

Puede medirse una "dosis terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral a partir de respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (RC) se define como ninguna evidencia de enfermedad, clínica, radiológica o de otro tipo. Una respuesta parcial (RP) resulta de una reducción en el tamaño tumoral agregado superior al 50%. La mediana del tiempo hasta la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

Una "dosis terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral también puede medirse a partir de su capacidad de estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto de inhibir el cáncer puede evaluarse en un sistema modelo animal predictivo de la eficacia para los tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse mediante el examen de la capacidad del compuesto de inhibir el crecimiento o apoptosis celular mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la materia. Una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto terapéutico puede reducir el tamaño tumoral, o de otro modo mejorar los síntomas en un sujeto. El experto ordinario en la materia podrá determinar dichas cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la severidad de los síntomas del sujeto y la composición particular o vía de administración seleccionada.

La composición debe ser estéril y líquida en la medida en que la composición puede administrarse con una jeringa. Además de agua, el portador puede ser una solución salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y mezclas adecuadas de los mismos. Puede mantenerse la fluidez correcta mediante, por ejemplo, la utilización de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de una dispersión y mediante la utilización de surfactantes. En muchos casos resulta preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro sódico en la composición. Puede conseguirse la absorción prolongada de las composiciones inyectables mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo monoestearato de aluminio o gelatina.

En el caso de que el compuesto activo se encuentre convenientemente protegido, tal como se ha indicado anteriormente, el compuesto puede administrarse oralmente, por ejemplo con un diluyente inerte o un portador comestible asimilable.

#### IV. Usos y métodos que implican a los anticuerpos de la invención

Los anticuerpos (incluyendo inmunoconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados indicados en la presente memoria) de la presente invención presentan numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos en los que participan célula que expresan CLD18. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse en células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o en sujetos humanos, por ejemplo *in vivo*, con el fin de tratar o prevenir una diversidad de trastornos, tales como los indicados en la presente memoria. Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "sujeto" pretende incluir seres humanos y animales no humanos que responden a los anticuerpos contra CLD18. Entre los sujetos preferentes se incluyen pacientes humanos que presentan trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la eliminación de células enfermas, en particular células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de CLD18 en comparación con las células normales.

Un efecto terapéutico en los tratamientos expuestos en la presente memoria preferentemente se consigue a partir de las propiedades funcionales de los anticuerpos de la invención para mediar en la eliminación de las células, por ejemplo induciendo la lisis mediada por citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), la lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica, y/o fagocitosis, preferentemente induciendo la lisis mediada por CDC y/o la lisis mediada por ADCC.

Por ejemplo, en una forma de realización, los anticuerpos de la presente invención pueden utilizarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CLD18, incluyendo, por ejemplo, el cáncer gástrico. Entre los ejemplos de enfermedades tumorógenas que pueden tratarse y/o prevenirse se incluyen todos los cánceres y entidades tumorales que expresan CLD18, incluyendo el cáncer de estómago, el cáncer esofágico, el cáncer pancreático, el cáncer pulmonar, el cáncer ovárico, el cáncer de mama, el cáncer colorrectal, el cáncer hepático, el cáncer de la vesícula biliar y cáncer de cabeza y cuello. Estos cánceres pueden encontrarse en estadios tempranos, intermedios o avanzados, por ejemplo en metástasis.

Las composiciones farmacéuticas y métodos de tratamiento descritos según la invención también pueden utilizarse para la inmunización o vacunación con el fin de prevenir una enfermedad indicada en la presente memoria.

En otra forma de realización, los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para detectar niveles de CLD18 o formas particulares de CLD18, o los niveles de las células que contienen CLD18 sobre su superficie membranal, los cuales pueden relacionarse con determinadas enfermedades o síntomas de enfermedad, tal como se ha indicado anteriormente. Alternativamente, los anticuerpos pueden utilizarse para reducir el número o interactuar con la función de las células expresantes de CLD18, convirtiendo de esta manera a estas células en importantes mediadores de la enfermedad. Lo anterior puede conseguirse poniendo en contacto una muestra y una muestra de

control con el anticuerpo anti-CLD18 bajo condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CLD18. Cualesquiera complejos formados entre el anticuerpo y CLD18 se detectan y se comparan en la muestra y una muestra de control, es decir, una muestra de referencia.

5 Los anticuerpos de la invención pueden someterse a ensayo inicialmente para su actividad de unión asociada a usos terapéuticos o diagnósticos *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden someterse a ensayo utilizando ensayos de citometría de flujo tal como se indica en la presente memoria.

10 Además, puede someterse a ensayo la actividad de los anticuerpos en la inducción de por lo menos una actividad de célula efectora mediada por un efector, incluyendo la inhibición del crecimiento y/o la eliminación de células que expresan CLD18. Por ejemplo, puede someterse a ensayo la capacidad de los anticuerpos de inducir CDC y/o apoptosis. En la presente memoria se describen protocolos de ensayo para la CC, la adhesión homotípica, el agrupamiento molecular o la apoptosis.

15 Los anticuerpos de la invención pueden utilizarse para inducir *in vivo* o *in vitro* una o más de las actividades biológicas siguientes: inhibición del crecimiento y/o diferenciación de una célula que expresa CLD18; eliminación de una célula que expresa CLD18; mediación en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CLD18 en presencia de células efectoras; mediación de la CDC de una célula que expresan CLD18 en presencia de complemento; mediación en la apoptosis de una célula que expresa CLD18; inducción de adhesión homotípica, y/o inducción de la traslocación a balsas de lípidos tras la unión a CLD18.

20 En una forma de realización particular, los anticuerpos son utilizados *in vivo* o *in vitro* para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de enfermedades relacionadas con CLD18. Entre los ejemplos de enfermedades relacionadas con CLD18 se incluyen, entre otras, cánceres tales como el cáncer gástrico, el cáncer pancreático, el cáncer esofágico, el cáncer pulmonar y cánceres tales como los presentados anteriormente.

30 CLD18A2 también se expresa en células de estómago normales diferenciadas. Los posibles efectos secundarios clínicos inducidos por anticuerpos derivados de la eliminación de dichas células pueden reducirse o evitarse mediante la administración en paralelo de fármacos protectores de estómago, tales como antácidos o inhibidores de la bomba gástrica de protones, tales como omeprazol o fármacos relacionados.

Las vías adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpo de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas de la técnica y pueden ser seleccionadas por el experto ordinario en la materia.

35 Tal como se ha indicado anteriormente, los anticuerpos anti-CLD18 de la invención pueden coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico y/o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunológicas contra los anticuerpos de la invención. El anticuerpo puede unirse al agente (en forma de complejo inmunológico) o puede administrarse separadamente del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o concurrentemente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo una terapia anticáncer, por ejemplo la radiación. Entre dichos agentes terapéuticos se incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tal como se ha indicado anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-CLD18 de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticáncer que funcionan mediante mecanismos diferentes, rindiendo un agente citotóxico para las células tumorales. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o un cambio de antigenicidad de las células tumorales que las convertiría en no reactivas con el anticuerpo.

50 En otra forma de realización particular de la invención, el sujeto en el que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente antiangiogénico, incluyendo anticuerpos con diana en VEGF o VEGFR y uno o más compuestos químicos inhibidores de la angiogénesis. El pretratamiento o la aplicación en paralelo de estos fármacos puede mejorar la penetración de los anticuerpos en tumores sólidos.

55 En otra forma de realización particular de la invención, el sujeto en el que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un compuesto que inhibe la señalización de receptores de factor de crecimiento, incluyendo anticuerpos monoclonales que se unen al receptor EGFR, así como compuestos químicos que inhiben la señalización iniciada por el receptor EGFR, Her1 ó Her2/neu.

60 Las células efectoras específicas de diana, por ejemplo células efectoras unidas a composiciones (por ejemplo anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) de la invención también pueden utilizarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser leucocitos humanos, tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Entre otras células se incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras de receptor de IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto que debe tratarse. Las células efectoras específicas de diana pueden administrarse en forma de suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administrado puede ser del orden de  $10^6$  a  $10^9$ , aunque variará dependiendo del objetivo terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para conseguir la localización

65

en la célula diana, por ejemplo una célula tumoral que expresa CLD18, y para llevar a cabo la eliminación celular mediante, por ejemplo, fagocitosis. Las vías de administración también pueden variar.

La terapia con células efectoras específicas de diana puede llevarse a cabo conjuntamente con otras técnicas para la eliminación de células diana. Por ejemplo, la terapia antitumoral utilizando las composiciones de la invención y/o células efectoras armadas con dichas composiciones puede utilizarse conjuntamente con quimioterapia. Además, puede utilizarse la inmunoterapia de combinación para dirigir dos poblaciones efectoras citotóxicas diferentes al rechazo de las células tumorales. Por ejemplo, pueden utilizarse anticuerpos anti-CLD18 unidas a anti-Fc-RI o a anti-CD3 conjuntamente con agentes de unión específicos de receptor de IgG o de IgA.

También pueden utilizarse moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la invención para modular los niveles de Fc-γR o Fc-αR sobre las células efectoras, tal como mediante adición de caperuza y eliminación de receptores sobre la superficie celular. También pueden utilizarse mezclas de receptores anti-Fc con este objetivo.

Las composiciones (por ejemplo anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) de la invención que presentan sitios de unión al complemento, tales como partes de IgG1, IgG2 ó IgG3 ó IgM que se unen al complemento, también pueden utilizarse en presencia del complemento. En una forma de realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprende células diana con un agente de unión de la invención y células efectoras apropiadas puede suplementarse mediante la adición de complemento o suero que contiene complemento. La fagocitosis de células diana recubiertas con un agente de unión de la invención puede mejorarse mediante la unión de proteínas del complemento. En otra forma de realización, también pueden ser lisadas por el complemento células diana recubiertas con las composiciones de la invención. En todavía otra forma de realización, las composiciones de la invención no activan el complemento.

Las composiciones de la invención también pueden administrarse conjuntamente con el complemento. De acuerdo con lo anteriormente expuesto, se encuentran comprendidas dentro del alcance de la invención composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones resultan ventajosas en el aspecto de que el complemento se encuentra situado en estrecha proximidad a los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la invención, y el complemento o suero pueden administrarse separadamente. La unión de las composiciones de la presente invención a las células diana provoca la traslocación del complejo de antígeno CLD18-anticuerpo a balsas de lípidos de la membrana celular. Dicha traslocación crea una densidad elevada de complejos de antígeno-anticuerpo que pueden activar eficientemente y/o intensificar la CDC.

Las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones para la utilización pueden estar comprendidas en un kit. El kit puede contener además uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo un anticuerpo que presenta una actividad complementaria).

De acuerdo con lo anteriormente expuesto, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la invención pueden administrarse además (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo del a invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que intensifica o potencia el efecto terapéutico de los anticuerpos de la invención.

En otras formas de realización, sujeto puede tratarse además con un agente que modula, por ejemplo incrementa o inhibe, la expresión o actividad de los receptores de Fc-γ o Fc-α mediante, por ejemplo, el tratamiento de un sujeto con una citocina. Entre las citocinas preferentes se incluyen el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), el interferón-γ (IFN-γ) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Otros genes importantes para incrementar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas indicadas en la presente memoria son los β-glucanos, que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificados y son producidos por una diversidad de plantas y microorganismos, por ejemplo bacterias, algas, hongos, levaduras y cereales. También pueden utilizarse fragmentos de β-glucanos producidos por organismos. Preferentemente, el β-glucano es un polímero de β(1,3)-glucosa, en el que por lo menos algunas de las unidades esqueléticas de glucosa, por ejemplo 3% a 6% de las unidades esqueléticas de glucosa, presentan ramificaciones tales como ramas β(1,6).

Los métodos para detectar la presencia de antígeno CLD18 en una muestra, o para medir la cantidad de antígeno CLD18 pueden comprender poner en contacto la muestra y una muestra de control con un anticuerpo que se une específicamente a CLD18, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o una parte del mismo y CLD18. La formación de un complejo seguidamente se detecta, en el que una diferencia en la formación de complejo entre la muestra y la muestra de control es indicativa de la presencia de antígeno CLD18 en la muestra.

Un método para detectar la presencia o para cuantificar la cantidad de células expresantes de CLD18 *in vivo* o *in vitro* puede comprender (i) administrar en un sujeto una composición de la invención conjugada con un marcador detectable, (ii) exponer el sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células expresantes de CLD18.

Los métodos como se describen anteriormente resultan útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con CLD18 y/o para la localización de enfermedades relacionadas con CLD18 tales como enfermedades de cáncer. Preferentemente, una cantidad de CLD18, preferentemente CLD18-A2 en una muestra, que es superior a la cantidad de CLD18, preferentemente de CLD18-A2, en una muestra de control es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con CLD18 en un sujeto, en particular un ser humano, a partir del cual se deriva la muestra.

Todavía en otra forma de realización, los inmunoconjugados de la invención pueden utilizarse para dirigir compuestos (por ejemplo agentes terapéuticos, marcajes, citotoxinas, radiotoxinas, inmunosupresores, etc.) a células que presentan CLD18 expresado sobre su superficie, mediante la unión de dichos compuestos al anticuerpo.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los ejemplos siguientes.

## Ejemplos

### 1. Generación de anticuerpos murinos contra CLD18

#### a. Inmunizaciones:

Se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 con vectores de expresión eucarióticos, codificantes de fragmentos de CLD18 humano (SEC ID nº 15, nº 16, nº 17 y nº 18). Se inyectaron 50 µg ó 25 µg de ADN plasmídico en el cuádriceps (intramuscular, i.m.) los días 1 y 10, para la generación de anticuerpos monoclonales de Juego1 o, alternativamente, los días 1 y 9, 1 y 11, ó 1, 16 y 36, para la generación de anticuerpos monoclonales de Juego2, en presencia de adyuvantes, por ejemplo CpG (para más detalles ver Tab. 1b). Se inyectó intramuscularmente CpG, así como células transfectadas con CLD18A2 (SEC ID nº 1) solas o cotransfectadas adicionalmente con ARN murino soluble codificante de CD40L; PEI-Man se inyectó intramuscular o intraperitonealmente. Se realizó un seguimiento de la presencia de anticuerpos dirigidos contra CLD18 humano en sueros de ratones mediante microscopia de inmunofluorescencia entre los días 16 y 43, dependiendo del protocolo específico de inmunización utilizado. Se determinó la inmunofluorescencia utilizando células HEK293 transfectadas transitoriamente con un ácido nucleico codificante de un constructo de fusión que comprende CLD18A2 humano (SEC ID nº 1 y nº 2) y una proteína informadora fluorescente. Los ratones con respuestas inmunológicas detectables (fig. 1) recibieron un refuerzo tres días antes de la esplenectomía para la generación de los anticuerpos monoclonales del Juego1, o los ratones recibieron un refuerzo tres días antes, tres y dos días antes, o recibieron un refuerzo cuatro, tres y dos días antes de la esplenectomía, para la generación de anticuerpos monoclonales del Juego2 mediante inyección intraperitoneal de  $5 \times 10^7$  ó alternativamente  $1 \times 10^8$  células HEK293 transfectadas transitoriamente con un ácido nucleico codificante de CLD18A2 humano (SEC ID nº 1, nº 2) (para más datos ver Tab. 1b). En la tabla 1a, los protocolos de inmunización utilizados se relacionan con los anticuerpos monoclonales respectivos.

**Tab. 1a: protocolos de inmunización utilizados para la generación de anticuerpos monoclonales**

mAb	Protocolo de inmunización*	mAb	Protocolo de inmunización
<b>Juego1</b>			
24H5	40	42E12	45
26B5	40	43A11	45
26D12	40	44E10	45
28D10	40	47D12	45
37G11	45	61C2	45
37H8	45	75B8	6
38G5	45	85A3	6
38H3	45	9E8	40
39F11	45	19B9	40
41C6	45		
<b>Juego2</b>			
45C1	53	166E2	51
125E1	45	175D10	51
163E12	51		

\* Para protocolos de inmunización específicos ver la Tab. 1b.

**Tab. 1b: protocolos de inmunización detallados**

Protocolo de inmunización	Inmunización (sensibilización y refuerzos con ADN)			Suero - seguimiento	Refuerzos con células transfectadas		
	Con vectores de ADN codificantes de fragmentos de CLD18	Con adyuvante	El día				
				El día	Células transfectadas con CLD18A2 (SEC ID nº 1) solas	Células cotransfectadas con CLD18A2 (SEC ID nº 1) y con ARN murino codificante de CD40L soluble	Días antes de la esplenectomía
6	SEC ID nº 15: 50 µg	50 µg de CpG	1 y 10	18	5x10 <sup>7</sup> células MC3T3 transfectadas	Ninguna	3
40	SEC ID nº 17: 50 µg	50 µg de CpG	1 y 10	18		5x10 <sup>7</sup> células HEK293; 100 µg de CPG a modo de adyuvante	3
45	SEC ID nº 15: 50 µg	50 µg de CpG	1 y 9	16		1x10 <sup>8</sup> células HEK293	3
51	SEC ID nº 15: 25 µg	2,5 µl de PEI-Man* (150 mM) en H <sub>2</sub> O con glucosa al 5%	1, 16 y 36	22, 30 y 43	5x10 <sup>7</sup> células HEK293 transfectadas	Ninguna	3 y 2
53	Sensibilización: SEC ID nº 15: 25 µg, y SEC ID nº 17: 25 µg; Refuerzo: SEC ID nº 17: 50 µg	50 µg de CpG en H <sub>2</sub> O con glucosa al 5%	1 y 11	20	5x10 <sup>7</sup> células HEK293 transfectadas	Ninguna	4, 3 y 2

\*jetPEI™-Man *in vivo* de PolyPlus Transfection

5

b. Generación de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos de CLD18:

Se aislaron esplenocitos de ratón y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón utilizando protocolos estándares. A continuación, los hibridomas resultantes se cribaron para la producción de inmunoglobulinas con especificidad para CLD18 utilizando células HEK293 transfectadas con un ácido nucleico codificante de CLD18 humano mediante análisis FACS. Se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicas procedentes de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no secretoras P3X63Ag8U.1 (ATCC nº CRL 1597) en una proporción 2:1 utilizando PEG al 50% (Roche Diagnostics, nº CRL 738641). Se sembraron las células en placas a razón de aproximadamente 3x10<sup>4</sup>/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de la incubación durante aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía suero de feto bovino al 10%, fusión de hibridoma al 2% y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, nº CRL 1 363 735) más HEPES 10 mM, 2-mercaptoetanol 0,055 mM, 50 µg/ml de gentamicina y 1xHAT (Sigma, nº CRL H0262). Tras 10 a 14 días, los pocillos individuales se cribaron mediante citometría de flujo para anticuerpos monoclonales anti-CLD18. Los hibridomas secretores de anticuerpos se sembraron en placa nuevamente, se cribaron nuevamente y, en el caso de que todavía fuesen positivos para anticuerpos monoclonales anti-CLD18, se subclonaron mediante dilución limitante. A continuación, los subclones se cultivaron *in vitro* para generar cantidades reducidas de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para la caracterización. Se seleccionó por lo menos un clon de cada hibridoma, que conservó la reactividad de las células parentales (según FACS). Se generaron 9 bancos de células viables para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

15

20

25

c. Selección de anticuerpos monoclonales de unión a CLD18:

para determinar el isotipo de los anticuerpos, se llevó a cabo un ELISA de los isotipos. Se utilizó el kit monoAB ID de ratón (Zymed, nº CRL 90-6550) o alternativamente el kit de isotipado de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, nº de cat. 1493027) para determinar las subclases de Ig de los anticuerpos monoclonales identificados como reactivos con CLD18. Definido como Juego1, se generaron diecinueve líneas celulares de hibridoma, seis de

30

una fusión de células procedente de un ratón C57/BL6 inmunizado con CLD18A2-BucleD3 (SEC ID nº 17, nº 18), trece de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle1 (SEC ID nº 15, nº 16), que expresaban los anticuerpos siguientes:

- 5 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9
- 10 24H5: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2b, 182-D758-034  
 26B5: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D758-035, DSM ACC2745  
 26D12: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D758-036, DSM ACC2746  
 28D10: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D758-040, DSM ACC2747  
 37G11: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D1106-055, DSM ACC2737  
 37H8: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-056, DSM ACC2738  
 38G5: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-057, DSM ACC2739  
 15 38H3: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-058, DSM ACC2740  
 39F11: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-059, DSM ACC2741  
 41C6: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D1106-060  
 42E12: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D1106-061, DSM ACC2748  
 43A11: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D1106-062, DSM ACC2742  
 20 44E10: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-063  
 47D12: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-064  
 61C2: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2b, 182-D1106-067, DSM ACC2743  
 75B8: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgM, 182-D756-001  
 85A3: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgM, 182-D756-002  
 25 9E8: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgM, 182-D758-011  
 19B9: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgM, 182-D758-024

30 Definido como Juego2, se generaron cinco líneas celulares de hibridoma, una de una fusión de células procedentes de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-BucleD3 (SEC ID nº 17, nº 18) y CLD18A2-BucleD1 (SEC ID nº 15, nº 16), cuatro de una fusión de células procedentes de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-BucleD1 (SEC ID nº 15, nº 16), que expresaban los anticuerpos siguientes:

- 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10
- 35 45C1: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D758-187  
 125E1: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG2a, 182-D1106-279, DSM ACC2808  
 163E12: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-294, DSM ACC2809  
 166E2: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG3, 182-D1106-308  
 175D10: anticuerpo  $\kappa$  monoclonal de ratón IgG1, 182-D1106-362, DSM ACC2810

40

## 2. Producción de anticuerpos monoclonales

Producción y purificación de anticuerpos monoclonales reactivos con CLD18:

45 Con el fin de producir cantidades mg de anticuerpo para la caracterización funcional, se sembraron células de hibridoma en biorreactores basados en diálisis (CELLLine CL1000, Integra, Chur, CH) a razón de  $2 \times 10^6$  células/ml. El sobrenadante que contenía anticuerpos se recolectó una vez a la semana. Se purificó el anticuerpo monoclonal de ratón utilizando Melon Gel (Pierce, Rockford, USA) y se concentró mediante precipitación con sulfato amónico o  
 50 alternativamente se purificó con proteína A utilizando FPLC. Se determinaron la concentración y la pureza de los anticuerpos mediante ensayo BCA y se comprobó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción de Coomassie.

## 3. Características de unión de los anticuerpos monoclonales

55 a. Control de calidad de los transfectantes en WB, IF:

Con el fin de generar células expresantes de CLD18A2, se transfectaron células HEK293 ó CHO con ácidos nucleicos codificantes de CLD18A2 (SEC ID nº 1, nº 2) o de CLD18A2-myc (SEC ID nº 3, nº 4).

60 Se transfectaron células HEK293 con CLDN18A2-myc (SEC ID nº 3, nº 4) o se dejaron sin transfectar. Veinticuatro horas después de la transfección se recolectaron las células, se lisaron y se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico. Se realizaron las transferencias del gel y se tiñeron con un anticuerpo anti-myc de ratón. Tras la incubación con un anticuerpo antiratón marcado con peroxidasa, se reveló la transferencia con reactivo ECL y se

visualizó utilizando un generador de imágenes LAS-3000 (Fuji). Sólo en las células transfectadas, pero no en el control negativo, se observó una banda con el peso molecular esperado para CLD18-myc (fig. 2).

Se transfectaron células CHO con CLD18A2 (SEC ID nº 1, nº 2) y se cultivaron en portaobjetos con cámara durante 24 horas. Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra CLD18 a razón de 1 µg/ml durante 60 minutos a 25°C. Tras el lavado, las células se tiñeron con una IgG de cabra anticonejo marcada con Alexa488 (Molecular Probes) y se evaluó mediante microscopía de fluorescencia. La fig. 3 muestra las células CHO transfectadas, que expresan CLD18 sobre la membrana celular, así como las células no transfectadas. Estas células expresantes de CLD18 heterológamente se utilizaron para los ensayos siguientes con el fin de someter a ensayo la especificidad de la unión de los anticuerpos.

b. Selección de anticuerpos monoclonales de unión a CLD18/Cribados primarios mediante citometría de flujo:

Se cotransfectaron células HEK293 con vectores de expresión codificantes de CLD18A2 humano (SEC ID nº 1, nº 2) y una proteína informadora fluorescente 40 horas antes del ensayo, o alternatively se utilizaron células HEK293 que expresaban establemente CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) y se contratiñeron con yoduro de propidio (YP). Tras el desprendimiento celular con EDTA/PBS 2 mM, las células se lavaron con medio de crecimiento completo y se sembraron a razón de aproximadamente 1 a  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de microtitulación de fondo en U. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadante de hibridoma, seguido de dos etapas de lavado con FBS al 1% inactivado por calor/PBS y finalmente incubación con anticuerpo secundario específico de IgG antiratón conjugado con APC o Alexa647. Tras dos etapas de lavado, las células cotransfectadas se fijaron con CellFIX (BD Biosciences). Se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSArray. Se muestra la expresión de marcadores de fluorescencia en el eje horizontal frente a la unión de anticuerpo en el eje vertical. Se detectó que todos los anticuerpos de ratón 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 se unían específicamente a la superficie de células expresantes de marcador de fluorescencia (fig. 4, células en Q2), tal como se ejemplificó para sobrenadantes de hibridoma que contienen los anticuerpos monoclonales 24H5 (fig. 4A, células en Q2), 85A3 (fig. 4B), 175D10, 125E1, 163E12, 166E2 y 45C1 (fig. 4C, células en Q1).

c. Comparación entre la unión de anticuerpos a CLD18A2 etiquetado con Myc o con HA:

Se especificaron adicionalmente las características de unión de los anticuerpos monoclonales específicos de CLD18 identificados. Por lo tanto, se analizó la unión de anticuerpos monoclonales a mutantes de CLD18A2, creados mediante inserción de etiquetas epítipo. CLD18A2-H1 (SEC ID nº 6) contiene una etiqueta epítipo-HA en CLD18A2-bucle1, mientras que CLD18A2-Myc (SEC ID nº 4) contiene una etiqueta epítipo Myc insertada en CLD18A2-bucle2. Debido a que la inserción de estas etiquetas provoca la destrucción de los epítipos, los anticuerpos monoclonales identificados pueden agruparse según la pérdida de unión a cualquiera de los mutantes. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales específicos de CLD18, células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 humano o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-HA, o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-Myc, seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa647. Antes del análisis en un BD FACSArray, las células se fijaron utilizando CellFIX. Tal como se ejemplificó para 24H5, 9E8, 26B5 y 19B9 en la fig. 5, pudieron separarse los anticuerpos monoclonales basándose en sus características de unión en cuatro grupos diferentes: (i) anticuerpos que se unen a CLD18A2 no modificado, así como a CLD18A2-HA y CLD18A2-Myc, por ejemplo 24H5 (fig. 5A), o (ii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA, por ejemplo 9E8 (fig. 5B), o (iii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-Myc, por ejemplo 26B5 (fig. 5C), o (iv) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA ni a CLD18A2-Myc, por ejemplo 19B9 (fig. 5D).

d. Comparación mediante citometría de flujo de la unión de anticuerpos a transfectantes humanos de CLD18A1 y de CLD18A2:

Se analizó mediante citometría de flujo la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales identificados a isoformas de CLD18A2. Se incubaron durante 30 minutos a 4 con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales, células HEK293 que expresaban establemente CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) y células HEK293 que expresaban establemente CLD18A1 humano (SEC ID nº 7, nº 8) (HEK293-CLD18A1), seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa647 y la fijación de células, o alternatively sin fijación pero con contratiñencia de YP. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSArray. La fig. 6 muestra ejemplos de dos grupos de anticuerpos monoclonales que se identificaron en el panel que comprende 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10: (i) los anticuerpos monoclonales 43A11, 45C1 y 163E12 se unen específicamente a CLD18A2 humano pero no a CLD18A1 humano (fig. 6A,B) e (ii) el anticuerpo monoclonal 37H8 se une a ambas isoformas humanas (fig. 6A).

e. Comparación entre la unión de anticuerpos a los transfectantes humanos CLD18A1 y CLD18A2 mediante microscopía de inmunofluorescencia:

5 Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con un vector de expresión codificante de una proteína de fusión de CLD18A1 (SEC ID nº 8) o de CLD18A2 (SEC ID nº 2) con un informador fluorescente y se cultivaron en portaobjetos con cámara. Las células se tiñeron sin fijar o tras la fijación con paraformaldehído con sobrenadante de cultivo de tejidos que contenía anticuerpo monoclonal durante 30 minutos a 37°C. Tras el lavado, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes). Se evaluó la unión de los anticuerpos mediante microscopía de fluorescencia. Tal como se muestra en la fig. 7, el anticuerpo 37G11 reaccionó específicamente con CLD18A2 (fig. 7A) pero no con CLD18A1 (fig. 7B). En contraste, el anticuerpo 26B5 era reactivo con ambos, CLD18A2 y CLD18A1 (fig. 8).

15 Para los anticuerpos 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8 y 19B9 se observó una clara diferencia entre la tinción de células vivas y células fijadas con paraformaldehído. Los anticuerpos formaron una tinción uniforme de las membranas al fijar las células (fig. 7C, 8C, 8D). En contraste, la incubación de células vivas con estos anticuerpos condujo a la generación de agrupamientos de proteínas, visibles en forma de patrón de tinción de tipo moteado (fig. 7A, 8A, 8B). Lo anterior demuestra que todos los anticuerpos se unen a los epítomos nativos en la forma en que se encuentran sobre la superficie de las células vivas.

20 f. Determinación de las líneas celulares de expresión endógena:

25 Se utilizó una pareja de cebadores específica para el gen CLD18A2 (SEC ID nº 11, nº 12) en análisis de RT-PCR para cribar las líneas celulares para la expresión de CLD18A2. Se encontró que las líneas celulares de carcinoma gástrico humano NCI-SNU-16 (ATCC nº CRL-5974) NUGC-4 (JCRB0834) y KATO-III (ATCC nº HTB-103) y la línea celular de adenocarcinoma pancreático humano DAN-G (DSMZ ACC249) mostraban una expresión endógena robusta de CLD18 (fig. 9). SE confirmó la expresión a nivel de las proteínas mediante tinción con un suero policlonal de conejo contra CLD18.

30 g. Tinción de líneas celulares de expresión endógena con anticuerpos específicos de CLD18 y análisis de inmunofluorescencia:

35 Se cultivaron células DAN-G, SNU-16, NUGC-4 y KATO-III en portaobjetos con cámara bajo condiciones estándares. Las células se encontraban no fijadas o alternativamente fijadas con metanol y teñidas con los anticuerpos respectivos. Para los anticuerpos 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, se observó tinción de la superficie celular, tal como se ejemplifica en las figs. 10, 11 y 12A. Para los anticuerpos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, se sometió a ensayo el reconocimiento de epítomos nativos y se observó tinción de la superficie celular sobre células no fijadas, tal como se muestra en la fig. 12B. Algunos subgrupos de anticuerpos mostraron tinción homogénea de la membrana celular, principalmente en las interfaces célula-célula o en partes libres de la membrana no contiguas a otras células. Otros anticuerpos tiñeron focos discretos y agregados sobre la membrana celular, demostrando que los anticuerpos respectivos se unen a diferentes epítomos, incluyendo epítomos que se encuentran enmascarados mediante asociación homotípica o heterotípica de CLD18, así como epítomos CLD18 accesibles en uniones estrechas preformadas.

45 h. Tinción de líneas celulares de expresión endógena mediante citometría de flujo:

50 Se analizó mediante citometría de flujo la expresión de CLD18A2 expresado constitutivamente sobre células KATO-III y NUGC-4 vivas. Lo anterior queda ejemplificado por células KATO-III y NUGC-4 teñidas con el anticuerpo 61C2 ó 163E12, seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa647 y la fijación de células o alternativamente sin fijación. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSAArray. La fig. 13 muestra una unión fuerte de 61C2 a por lo menos 70,3% de las células KATO-III y de 163E12 a CLD18A2 sobre células KATO-III y NUGC-4.

55 i. Alineación de secuencias de CLD18A1 y CLD18A2 de ratón y humanas

60 CLD18A2 humano (NP\_001002026) y CLD18A1 humano (NP\_057453) en una comparación entre secuencias difieren en el extremo N-terminal y las variantes de CLD18 de ratón (NP\_062789 y AAL15636) demuestran elevada homología y sitios de variación de secuencia entre las moléculas (ver la fig. 14).

j. Reactividad de anticuerpos con CLD18A1 murino y CLD18A2 murino analizada mediante citometría de flujo:

65 La unión de los anticuerpos monoclonales identificados contra CLD18A2 y CLD18A1 murinos se analizó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 murino (SEC ID nº 33, nº 35) o con un marcador de fluorescencia y CLD18A1 murino (SEC ID nº 36, nº 37) se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían los anticuerpos monoclonales específicos de

5 CLD18 humano 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 y 163E12, respectivamente, durante 30 minutos a 4°C, seguido de la incubación con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con Alexa647 y la fijación de las células. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSAarray. La fig. 15 muestra tres perfiles de unión diferentes: 38G5 y 45C1 no se unen a ninguna de las isoformas de CLD18 murino; 37G11 y 163E12 se unen a CLD18A2 murino pero no a CLD18A1 murino, y 38H3 se une a CLD18A1 y CLD18A2 murinos. Estos anticuerpos son herramientas valiosas para determinar una toxicidad potencial de los anticuerpos monoclonales de CLD18 en estudios preclínicos.

10 En conjunto estos datos demuestran que los anticuerpos monoclonales de la invención 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 generados contra CLD18 representan una diversidad de características de unión con diferentes epítomos y topologías de CLD18 humano.

15 Puede utilizarse una combinación de diferentes propiedades descritas en los Ejemplos 3b, c, d, e, g, h y j para clasificar los anticuerpos monoclonales en dichas clases diferentes.

#### 4. Inmunohistoquímica (IHC)

20 Se utilizó un anticuerpo específico de epítomo CLD18A2 generado mediante inmunización con el péptido de SEC ID nº 21, para la caracterización inmunohistoquímica de la expresión de CLD18A2. Se utilizaron secciones de tejido incluidas en parafina derivadas de un panel completo de tejidos normales y tumorales, para análisis de expresión y localización de proteínas. No se detectó expresión significativa en ningún otro tejido de órgano normal excepto del estómago (ver la Tab. 2, fig. 16A). En contraste, se verificó la expresión de CLD18A2 mediante inmunohistoquímica en diferentes cánceres, incluyendo el cáncer de estómago y el cáncer de pulmón (fig. 16B).

25 Resulta interesante que la expresión de proteína CLD18A2 en la mucosa gástrica se encontraba restringida a células diferenciadas terminalmente del epitelio gástrico en las regiones de base y de fosa. En contraste, las células en la región del cuello de la mucosa gástrica, en particular las células madre gástricas en la parte del istmo, que reabastecen la mucosa entera, no expresan CLD18A2 (fig. 16C).

30

**Tab. 2: expresión de CLD18A2 en tejidos normales y tumorales según el análisis IHC**

Tipo de tejido	Resultado
Adrenal	-
Vejiga	-
Células sanguíneas	-
Médula ósea	-
Mama	-
Colon	-
Endotelio	-
Esófago	-
Conducto de Falopio	-
Corazón	-
Riñón (glomérulo, túbulo)	-
Hígado	-
Pulmón	-
Nódulo linfático	-
Ovario	-
Páncreas	-
Paratiroides	-
Pituitaria	-
Placenta	-
Próstata	-
Piel	-
Bazo	-
Estómago	+
Músculo estriado	-
Testículo	-
Timo	-
Tiroides	-
Uréter	-
Útero (cérvix, endometrio)	-

35 Se utilizó el anticuerpo monoclonal 39F11 para estudios inmunohistoquímicos específicos de CLD18A2. Tal como se muestra en la fig. 17A, no era detectable reactividad significativa en todos los tejidos normales sometidos a ensayo

excepto el estómago (fig. 17A), mientras que los carcinomas de estómago y los carcinomas pulmonares siguieron siendo fuertemente positivos (fig. 17B).

5 Otro grupo de anticuerpos de la invención mostraba un patrón de tinción de cáncer específico con la unión a cáncer de estómago pero sin reactividad con el tejido de estómago normal. Se muestra dicho patrón de tinción en la fig. 18A con el anticuerpo monoclonal 26B5.

10 Se utilizó la inmunohistoquímica para el análisis de especificidad de 175D10 (fig. 18B), 43A11 (fig. 18C), 163E12 (fig. 18D) y 45C1 (fig. 18E) de secciones derivadas de líneas celulares tumorales HEK293: se xenoinjertaron líneas celulares tumorales HEK293 que expresaban establemente CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) o CLD18A1 (HEK293-CLD18A1) o transfectadas con un plásmido de control de la expresión que contenía únicamente el gen de resistencia a antibióticos para la selección (HEK293-simulado), en ratones para formar tumores sólidos. No era detectable expresión en los tumores xenoinjertados de HEK293 transfectados simuladamente. En contraste, se observó una tinción membranal fuerte y homogénea en los tumores xenoinjertados HEK293-CLD18A2 y en especímenes de carcinoma de estómago.

### 5. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

20 a. CDC de anticuerpos monoclonales de Juego1 medida mediante citometría de flujo:

Se preparó plasma para la lisis del complemento mediante extracción de sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer S-Monovette-EDTA (Sarstedt, Nürnberg, Alemania), que seguidamente se centrifugaron a 600g durante 20 minutos. Se recolectó el plasma y se almacenaron a -20°C.

25 En un primer conjunto de experimentos, se analizaron sobrenadantes de hibridoma para su capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células HEK293 que expresasen establemente CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2). Las células se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían los anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10, 24H5 ó 26D12, respectivamente, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación (5 minutos a 450g), se separó el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) al las células y se incubó durante 20 minutos adicionales a 37°C. A continuación, se determinó la lisis celular en FACS mediante la utilización del método de tinción con yoduro de propidio (YP). Se añadió YP hasta una concentración final de 2,5 µg/ml. Para la citometría de flujo, se utilizó un citómetro de flujo BD FACSArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recogieron por lo menos 10.000 sucesos para el análisis, excluyendo los residuos celulares mediante ajuste del umbral de dispersión frontal-lateral (FCS). El porcentaje de células lisadas (células YP-positivas) se muestra en la figura 19. Los anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10 y 26D12 indujeron lisis de 33,5%, 38,2% y 39,2%, respectivamente, de las células HEK293-CLD18A2, mientras que la CDC mediada por 24H5 fue de sólo 19,3%.

40 b. CDC de anticuerpos monoclonales del Juego1:

En un segundo conjunto de experimentos, se analizó la especificidad de los anticuerpos monoclonales en la inducción de CDC sobre células expresantes de CLD18A2. Por lo tanto, se sometió a ensayo un conjunto de anticuerpos de unión específicamente a CLD18A2 humano o que también se unían a CLD18A1 humano, para comprobar la inducción de CDC contra las células CHO establemente transfectadas con CLD18A2 humano (CHO-CLD18A2) o CLD18A2 humano (CHO-CLD18A1). Se sembraron células CHO-CLD18A2 y CHO-CLD18A1 24 horas antes del ensayo con una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo en placas de microtitulación para cultivo de tejidos de fondo plano. Al día siguiente, se eliminó el medio de crecimiento y las células se incubaron por triplicado con sobrenadantes de hibridoma ajustados a una concentración de 10 µg/ml que contenían los anticuerpos monoclonales 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12 y 61C2, respectivamente. Se incubaron células de control con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contenía saponina al 0,2% para determinar el nivel de lisis de fondo y máximo, respectivamente. Tras incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante 20 minutos adicionales a 37°C. A continuación, se sustituyeron los sobrenadantes por PBS que contenía 2,5 µg/ml de bromuro de etidio y se midió la emisión de fluorescencia tras la excitación a 520 nm utilizando un sistema Tecan Safire. Se calculó el porcentaje de lisis específica de la manera siguiente: % de lisis específica = (fluorescencia de la muestra - fluorescencia de fondo) / (fluorescencia lisis máxima - fluorescencia de fondo) x 100. La fig. 20 muestra que los anticuerpos monoclonales 26D12, 28D10, 37H8, 38H3 y 39F11 median en una CDC baja; el anticuerpo monoclonal 38G5 media en un nivel intermedio de CDC; los anticuerpos monoclonales 41C6 y 61C2 median en un nivel bajo de CDC y los anticuerpos monoclonales 24H5, 37G11, 42E12, 43A11, 44E10 y 47D12 median en una CDC nula contra las células CHO-CLD18A2. En contraste, ninguno de los anticuerpos fue capaz de inducir CDC contra las células CHO-CLDA1, aunque 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 41C6, 47D12 y 61C2 también se unían a CLD18A1 según se determinó mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia.

## c. Titulación de anticuerpos monoclonales y CDC utilizando anticuerpos monoclonales del Juego1:

con el fin de medir la capacidad de los anticuerpos anti-CLD18 de inducir CDC a bajas concentraciones, se llevó a cabo un experimento en el que se titularon tres anticuerpos diferentes. SE incubaron células CHO-CLD18A2 en placas de microtitulación con un intervalo de concentraciones de 75B8 (100, 30, 10, 3 y 1 µg/ml), 37H8 (10, 3,3 y 1 µg/ml) y 28D10 (10, 1 y 0,1 µg/ml), respectivamente, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubaron durante 20 minutos adicionales a 37°C. Antes del análisis utilizando un Tecan Safire, los sobrenadantes se sustituyeron por PBS que contenía 2,5 µg/ml de bromuro de etidio. Las figuras 21A-C muestran el porcentaje de lisis específica como función de la concentración de anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 75B8 induce la lisis de 31,0% de las células CHO-CLD18A2 a una concentración de 10 µg/ml y cae a 6,2% a 1 µg/ml (fig. 21A), mientras que los anticuerpos monoclonales 28D10 y 37H8 todavía inducen 39% y 26,5% de lisis específica a 1 µg/ml (fig. 21B, C), respectivamente.

## d. CDC de anticuerpos monoclonales del Juego2 medida mediante citometría de flujo:

se preparó suero para la lisis mediada por el complemento mediante la extracción de sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer Serum-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania) que seguidamente se centrifugaron a 600g durante 20 minutos. Se recolectó el suero y se almacenó a -20°C. El suero de control se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos antes del almacenamiento.

Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma para su capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humano. Se incubaron células con sobrenadantes de hibridoma crudo o purificado que contenían los anticuerpos monoclonales 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, respectivamente, durante 30 minutos a 37°C. Se añadió suero humano al 20% en RPMI a las células y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 37°C. A continuación, se determinó la lisis celular mediante FACS utilizando el método de tinción con yoduro de propidio (YP). Se añadió YP hasta una concentración final de 2,5 µg/ml. Para la citometría de flujo, se utilizó un citómetro de flujo BD FACSAarray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recogieron por lo menos 10.000 sucesos para el análisis, excluyendo los residuos celulares mediante ajuste del umbral de dispersión frontal-lateral (FSC/SSC). Se calculó la lisis específica mediante la fórmula siguiente: lisis específica = (% de células YP-positivas - % de células YP-positivas en la muestra con suero inactivado por calor). Se observó lisis robusta mediada por CDC, en particular con 163E12.

6. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se analizaron sobrenadantes de hibridoma para su capacidad de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células HEK293 que expresaban establemente CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) o CLD18A1 humano (HEK293-CLD18A1).

a. Enriquecimiento en células mononucleares de sangre periférica humanas: se diluyó sangre humana procedente de donantes sanos dos veces en tampón fosfato (PBS) y se dispusieron en capas sobre Ficoll (medio de separación de linfocitos 1.077 g/ml, PAA Laboratories, nº de cat. J15-004). Se recogieron células mononucleares de sangre periférica (MNC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero de feto bovino al 10% inactivado por calor, L-glutamina 2 mM.

b. Experimento de ADCC: se marcaron células diana con un ligando intensificador de fluorescencia (BADTA, kit de ensayo de citotoxicidad de Perkin-Elmer DELFIA EuTDA reactivos de citotoxicidad, nº de cat. AD0116) durante 30 minutos. Tras el lavado extensivo en RPMI-10 suplementado con probenecid 10 mM (Sigma, nº de cat. P8761), HEPES 10-20 mM y suero de feto bovino al 10% inactivado por calor, las células se ajustaron a  $1 \times 10^5$  células/ml. Las células diana marcadas, células efectoras (MNC) y sobrenadantes que contenían anticuerpos monoclonales ajustados a una concentración de 10 µg/ml se añadieron a placas de microtitulación de fondo redondo. Para las células efectoras aisladas, se utilizó una proporción de células efectoras a células diana (E:D) de 100:1 (datos no mostrados para 50:1 y 25:1). Tras la incubación (2 horas, 37°C), se detuvieron los ensayos mediante centrifugación y se midió la liberación de ligando de fluorescencia de muestras por duplicado, como pulsos de europio, en un fluorímetro con resolución temporal. Se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular utilizando la fórmula siguiente: % de lisis específica = (pulsos de liberación experimental - pulsos de liberación espontánea) / (pulsos de liberación máxima - pulsos de liberación espontánea) x 100, determinando la liberación máxima de ligando de fluorescencia mediante la adición de Triton X-100 (concentración final de 0,25%) a las células diana, y midiendo la liberación espontánea en ausencia de anticuerpos y células efectoras. La figura 22 muestra que los anticuerpos monoclonales 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2 median en la ADCC contra las células HEK293-CLD18A2. En contraste, estos anticuerpos no indujeron citotoxicidad significativa o un nivel bajo de citotoxicidad sobre las dianas CLD18A1, demostrando una ADCC específica para CLD18A2 (figura 23).

7. Inhibición de la proliferación

Se analizaron anticuerpos monoclonales murinos purificados para su capacidad de inhibir el crecimiento celular de células KATO-III que expresaban endógenamente CLD18A2 humano.

5 Se cultivaron  $1 \times 10^4$  células diana que expresaban endógenamente CLD18A2 (KATO-III) en presencia de aproximadamente 10  $\mu\text{g}$  de anticuerpos monoclonales.

10 El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, nº de cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de las células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta utilizando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y el ADN se desnaturaliza utilizando solución de fijación. El anticuerpo no unido se elimina mediante lavado y el inductor DELFIA se añade para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado hacia la solución, en donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida (mediante fluorimetría con resolución temporal en la detección) es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pocillo.

15 Se observó una fuerte inhibición de la proliferación con los anticuerpos 125E1, 163E12, 45C1, 37G11, 37H8, 28D10 y 166E2, respectivamente. Se observó una inhibición moderada de la proliferación con los anticuerpos murinos 43A11, 175D10, 42E12, 26D12, 61C2 y 38H3, respectivamente.

8. Rendimiento en modelos terapéuticos de xenoinjerto de ratón

25 Se estudió el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales identificados de unión específica a CLD18A2 en modelos de xenoinjerto terapéuticos.

a. Tratamiento precoz de tumores de alta expresión de CLD18A2 en ratones

30 Se inocularon  $1 \times 10^7$  células HEK293 que expresaban establemente niveles elevados de CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) por vía subcutánea en ratones SCID. Los niveles de expresión de CLD18A2 humano en células HEK293-CLD18A2 eran comparables, con niveles de expresión en cánceres gástricos primarios de pacientes. Cada grupo de tratamiento experimental comprendía 10 ratones (número de ratones en cada grupo,  $n=10$ ). La terapia de los ratones se inició 3 días después de la inoculación de tumor. Se inyectaron 200  $\mu\text{g}$  de sobrenadantes de hibridoma purificados que representaban los anticuerpos monoclonales 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 39F11, 42E12, 43A11, 38H3 ó 61C2, una vez a la semana durante 4 semanas por vía intravenosa. Alternativamente, se administraron 200  $\mu\text{g}$  de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían los anticuerpos monoclonales murinos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 ó 175D10 dos veces a la semana durante 6 semanas alternando las inyecciones intravenosa e intraperitoneal. Se realizó un seguimiento del crecimiento tumoral de los ratones tratados dos veces a la semana (volumen tumoral = longitud x anchura x anchura dividida por 2, en  $\text{mm}^3$ ). Los ratones fueron sacrificados en el caso de que el tumor alcanzase un volumen de 500  $\text{mm}^3$  o en caso de morbilidad severa. La fig. 24 ejemplifica una inhibición robusta del crecimiento de las células tumorales HEK293-CLD18A2 por los anticuerpos de la invención. Las figs. 25A y 25B muestran la prolongación de la supervivencia mediante tratamiento con anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz utilizando células HEK293-CLD18A2.

45 b. Tratamiento de inicio tardío de tumores avanzados de alta expresión de CLD18A2 en ratones

Se diseñó el mismo modelo de xenoinjerto tumoral basándose en células HEK293-CLD18A2 en forma de un protocolo de inicio tardío de la terapia, en contraste con el tratamiento precoz descrito anteriormente. El día 27 después de la inoculación de las células tumorales, los ratones se asignaron aleatoriamente a grupos de ensayo, comprendiendo cada grupo 5-6 ratones e iniciando la terapia con 200  $\mu\text{g}$  de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían los anticuerpos monoclonales murinos 43A11, 163E12 y 175D10, respectivamente. Se administraron anticuerpos dos veces a la semana durante 6 semanas, alternando las inyecciones intravenosa e intraperitoneal. Además, en este modelo se demostró que los anticuerpos de la invención inhibían el crecimiento tumoral. Para varios anticuerpos lo anterior resultó en la prolongación de la supervivencia (fig. 26).

55 c. Tratamiento precoz de tumores que expresan niveles bajos de CLD18A2

60 Se inocularon en ratones SCID por vía subcutánea  $2 \times 10^5$  células de la línea celular tumoral DAN-G, una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano infiltrante que expresa constitutivamente proteína CLD18A2 a nivel bajo. Se inició el tratamiento de los ratones (10 en cada grupo) 3 días después de la injertación de los tumores: se administraron 200  $\mu\text{g}$  de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían los anticuerpos monoclonales murinos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 ó 175D10 dos veces a la semana durante 6 semanas, alternando las inyecciones intravenosa e intraperitoneal. Debido al rápido y agresivo crecimiento tumoral de la línea celular tumoral DAN-G pancreático, los ratones desarrollaron caquexia tumoral y murieron en unos pocos días. Sin embargo, en consecuencia, la ventana para medir los efectos terapéuticos era estrecha, también se observó en este modelo

inhibición del crecimiento tumoral y supervivencia prolongada mediada por los anticuerpos de la invención (figs. 27A y 27B).

d. Los anticuerpos de la invención no inducen efectos secundarios en ratones

5 Se utilizó una pareja de cebadores específica para CLD18A2 murino (s: CTA CCA AGG GCT ATG GCG TTC, as: GCA CCG AAG GTG TAC CTG GTC) en análisis de RT-PCR en la amplificación de ADNc derivado de un panel completo de tejidos de ratón normales (ver la fig. 28).

10 La expresión de CLD18A2 murino no era detectable en ninguno de los tejidos normales sometidos a ensayo, excepto en los de estómago (ver la fig. 28). Además, un anticuerpo específico para CLD18A2, el cual reacciona cruzadamente con CLD18A2 humano y de ratón, se utilizó para el análisis inmunohistoquímico de la expresión de CLD18A2 en un panel de gran tamaño de tejidos normales de ratón (ver la Tab. 3). Excepto para el tejido gástrico normal, todos los tejidos normales sometidos a ensayo no mostraron expresión de CLD18A2. Al igual que se había observado para CLD18A2 humano, los presentes inventores también observaron para la contrapartida de ratón que, aunque las células epiteliales superficiales y las células de cripta más profundas expresaban CLD18A2 en la superficie celular, la región central de cuello era negativa para CLD18A2 (ver la fig. 29 A-C). En resumen, la distribución en los tejidos de CLD18A2 aparentemente era idéntica en el ser humano y en el ratón.

20 **Tab. 3: expresión de CLD18 en tejidos normales murinos analizados mediante inmunohistoquímica**

tejido	Expresión de CLD18
Cerebelo	-
Cerebro	-
Colon	-
Esófago	-
Corazón	-
Riñón	-
Hígado	-
Pulmón	-
Nódulo linfático	-
Ovario	-
Páncreas	-
Músculo esquelético	-
Bazo	-
Estómago	+
Timo	-
Vejiga	-

25 Se investigaron adicionalmente los efectos secundarios mediados por los anticuerpos 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 en ratones. Todos dichos anticuerpos habían demostrado previamente en análisis FACS la reacción con CLD18A2 murino, así como con la proteína humana.

Tampoco se observó ningún efecto secundario visible en los ratones durante y después del tratamiento con dichos anticuerpos, ni se observaron correlatos histomorfológicos de toxicidad en la mucosa gástrica de los ratones tratados con anticuerpos en comparación con los ratones no tratados (tratados con PBS) (ver la figura 30).

30 9. Quimerización de anticuerpos

a. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/humanos

35 Se preparó ARN total y seguidamente ADNc de cadena sencilla a partir de células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) y de tejido de bazo humano mediante métodos estándares conocidos por el experto en la materia, por ejemplo mediante la utilización del kit RNeasy Midi (Qiagen) y la transcriptasa inversa Superscript II (Invitrogen).

40 La región constante de la cadena ligera kappa humana se amplificó a partir de ADNc de PBMC mediante PCR. El oligómero de sentido (SEC ID nº 38) añadió un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' de la región constante y modificó la secuencia de ácidos nucleicos original 5'-CGAACT-3' codificante para los primeros dos aminoácidos (Arg-Thr) de la región constante en 5'-CGTACG-3', generando un sitio de restricción BsiWI sin modificar la secuencia de aminoácidos. El oligómero antisentido (SEC ID nº 39) incluía un codón de parada y añadió un sitio de restricción NotI en el extremo 3' de la región constante amplificada. El producto de PCR, así como un vector de expresión estándar (por ejemplo pcDNA3.1(+), Invitrogen) se incubaron secuencialmente con los enzimas de restricción BamHI y NotI. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal bovina para evitar la recirculación. La región constante finalmente se ligó en el vector, de manera que cualquier fusión futura de una región variable enfrente de la

región constante ahora resulta posible mediante un sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') procedente del sitio de clonación múltiple del vector residual y mediante el sitio de restricción BsiWI (5'-CGTACG-3') generado con el producto de PCR. La secuencia de la región constante de cadena ligera kappa humana insertada en el vector se presenta como SEC ID nº 40, la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana se presenta como SEC ID nº 41.

La región constante de la cadena pesada  $\gamma$ -1 humana se amplificó a partir de ADNc de bazo mediante PCR. Se introdujo el oligómero de sentido 5'-fosforilado (SEC ID nº 42) en el sitio de restricción Apal natural, situado 11 nucleótidos cadena abajo del inicio de la región constante, y se añadió un sitio de restricción HindIII en el extremo 5' de la parte amplificada de la región constante. El oligómero antisentido 5'-fosforilado (SEC ID nº 43) incluía un codón de parada y añadió un sitio de restricción NotI en el extremo 3' de la región constante amplificada de esta manera. El producto de PCR generado de esta manera presentaba extremos romos y se encontraba 5'-fosforilado. La región constante y amplificada se verificó que era de la subclase IgG1 mediante PCR con un oligómero antisentido discriminante (SEC ID nº 44) y mediante secuenciación. Un vector de expresión estándar (por ejemplo pcDNA3.1(+)/Hygro, Invitrogen) con una resistencia de antibiótico diferente (por ejemplo a higromicina) que la del vector utilizado para la expresión de la cadena ligera (por ejemplo a neomicina) se incubó con el enzima de restricción PmeI para eliminar por completo el sitio de clonación múltiple, dejando extremos romos. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal bovina para evitar la recirculación. La región constante finalmente se ligó en el vector, de manera que cualquier fusión futura de una región variable enfrente de la región constante ahora resultase posible mediante el sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') y mediante el sitio de restricción Apal (5'-GGGCC-3'), ambos generados con el producto de PCR. La orientación correcta de la región constante en el vector, es decir, adecuada para el promotor anterior del vector, se verificó mediante secuenciación. Debido a la posición del sitio de restricción Apal, cualquier amplificación de una región variable con dicho fin debe incluir los primeros 11 nucleótidos de la secuencia de la región constante  $\gamma$ -1 humana además de la secuencia del sitio Apal. La secuencia de la región constante de cadena pesada  $\gamma$ -1 humana amplificada de esta manera que se ha insertado en el vector se presenta como SEC ID nº 45, la secuencia de aminoácidos de la región constante  $\gamma$ -1 humana expresada de esta manera se presenta como SEC ID nº 46.

**Tab. 4: líneas celulares de hibridoma de ratón utilizadas para la clonación de anticuerpos**

	clon	mAb	Isotipo	Región variable	Pareja de oligómeros en la PCR	Anticuerpo quimerizado
Cadena pesada	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEC ID nº 55, 132	SEC ID nº 70, 71	SEC ID nº 100, 115
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEC ID nº 56, 133	SEC ID nº 72, 73	SEC ID nº 101, 116
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEC ID nº 57, 134	SEC ID nº 74, 75	SEC ID nº 102, 117
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEC ID nº 59, 136	SEC ID nº 78, 79	SEC ID nº 104, 119
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEC ID nº 58, 135	SEC ID nº 76, 77	SEC ID nº 103, 118
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEC ID nº 60, 137	SEC ID nº 80, 81	SEC ID nº 105, 120
Cadena ligera	43A11	182-D1106-062	IgK	SEC ID nº 62, 139	SEC ID nº 84, 85	SEC ID nº 107, 122
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEC ID nº 61, 139	SEC ID nº 82, 83	SEC ID nº 106, 121
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEC ID nº 63, 140	SEC ID nº 86, 87	SEC ID nº 108, 123
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEC ID nº 66, 143	SEC ID nº 92, 93	SEC ID nº 111, 126
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEC ID nº 65, 142	SEC ID nº 90, 91	SEC ID nº 110, 125
	45C1	182-D758-187	IgK	SEC ID nº 64, 141	SEC ID nº 88, 89	SEC ID nº 109, 124
	45C1	182-D758-187	IgK	SEC ID nº 67, 144	SEC ID nº 94, 95	SEC ID nº 112, 127
	45C1	182-D758-187	IgK	SEC ID nº 68, 145	SEC ID nº 96, 97	SEC ID nº 113, 128
45C1	182-D758-187	IgK	SEC ID nº 69, 145	SEC ID nº 98, 99	SEC ID nº 114, 129	

En correspondencia con sus contrapartidas murinas, los anticuerpos monoclonales murinos se denominaron añadiendo un prefijo "ch", por ejemplo ch-43A11, ch-163E12, ch-125E1, ch-166E2, ch-175D10 y ch-45C1.

La amplificación de las regiones variables murinas de cadenas ligeras y pesadas se llevó a cabo según el método de PCR "step out" descrito en Matz *et al.* (Nucleic Acids Research 27(6), 1999). Para ello, se preparó ARN total a partir de líneas celulares de hibridoma monoclonal (ver la Tab. 4) mediante métodos estándares conocidos por el experto en la materia, por ejemplo utilizando el kit RNeasy Mini (Qiagen). Se preparó ADNc de cadena sencilla según el método de "intercambio de molde" también descrito en Matz *et al.* (Nucleic Acids Research 27(6):1558, 1999). Además de un oligómero (dT)30 (SEC ID nº 47), incluía un oligómero híbrido de ADN/ARN (SEC ID nº 48) utilizado a modo de adaptador 5' para el intercambio de molde durante la polimerización de la cadena de ADNc. En este oligómero adaptador, los últimos tres nucleótidos eran ribonucleótidos y no desoxirribonucleótidos. La PCR "step-out" siguiente utilizada como oligómero antisentido presentaba como diana la región constante de la cadena kappa de ratón o la región constante de las subclases 1, 2a ó 3 de las cadenas  $\gamma$  (SEC ID nº 49 a nº 52, respectivamente). La subclase IgG del anticuerpo monoclonal murino producido por las líneas celulares de hibridoma se analizó inmunológicamente utilizando IsoStrip (ver el Ejemplo 1) y de acuerdo con ella se seleccionó el oligómero antisentido

apropiado (ver la Tab. 4). Una primera mezcla sirvió como oligómero de sentido en la PCR "step-out", que comprendía los dos oligómeros presentados en SEC ID nº 53 y nº 54. Algunas líneas celulares de hibridoma expresaban más de una cadena pesada o ligera (además de las cadenas expresadas por la línea celular de mieloma utilizada para la generación de hibridomas). La Tabla 4 resume los SEC ID nº de las regiones variables clonadas y secuencias de las cadenas de anticuerpos murinos (SEC ID nº 55 a nº 69 y SEC ID nº 132 a nº 146) y de las cadenas de anticuerpo quimérico de longitud completa clonadas y secuenciadas (SEC ID nº 100 a nº 129).

Las regiones variables murinas identificadas seguidamente se amplificaron mediante PCR omitiendo la UTR 5' y la región 3' constante de ratón, añadiendo sitios de restricción a los extremos, lo que permitió la subclonación en los vectores de expresión preparados que portaban las regiones constantes humanas. Además, los oligómeros de sentido proporcionaron una secuencia Kozak de consenso (5'-GCCGCCACC-3' ó 5'-AGCCACC-3') y los oligómeros antisentido para las regiones variables de cadena pesada incluían los primeros 11 nucleótidos de la región constante y-1 humana además del sitio de restricción Apal (ver la Tab. 4, SEC ID nº 70 a nº 99). Las regiones variables de cadena ligera kappa se clonaron utilizando los sitios de restricción HindIII y BsiWI, las regiones variables de cadena pesada y requerían los enzimas de restricción HindIII y Apal. La región variable de cadena pesada y del anticuerpo monoclonal 45C1 contenía un sitio de restricción HindIII interno (en la presente memoria se utilizó por el contrario el enzima BsaI compatible (ver SEC ID nº 80)). SEC ID nº 100 a nº 114 mostraban las secuencias de ácidos nucleicos de los anticuerpos quimerizados resultantes (ver la Tab. 4). SEC ID nº 115 a nº 129 muestran las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos quimerizados expresados de acuerdo con lo anterior (ver la Tab. 4).

#### b. Generación y producción de anticuerpos quiméricos contra CLD18

Se generaron líneas celulares de mamífero productoras de anticuerpos quiméricos con especificidad para CLD18. Las líneas celulares se derivaron de células HEK293T (ATCC nº CRL-11268). Un día antes de la transfección, se sembraron  $2,5 \times 10^7$  células en una placa de cultivo de tejidos de 14,5 cm y se cultivaron en 20 ml de medio completo, o alternativamente se sembraron  $1 \times 10^7$  células en una palca de cultivo de tejidos de 10 cm y se cultivaron en 10 ml de medio completo, o alternativamente se sembraron  $0,6 \times 10^6$  células en un pocillo de una placa para tejidos de 12 pocillos y se cultivaron en 2-3 ml de medio completo (medio completo: medio DMEM:F12 suplementado con FBS al 10% con antibióticos). La densidad celular recomendada en el momento de la transfección debía alcanzar el 90% de confluencia. Inmediatamente antes de la transfección se sustituyó el medio por medio fresco. Se transfectaron células HEK293T con reactivos de transfección, por ejemplo lipofectamina 2000 (Invitrogen, 11668-019), o alternativamente polietilenimina (Sigma-Aldrich, 408727). A título de ejemplo para la transfección de células HEK293t, se utilizó una cantidad total de ADN de 110 µg o se utilizaron 296 µg para una placa para tejidos de 14,5 cm, y la proporción de agente de transfección a ADN fue de 1:2,5 y 1:12 para lipofectamina 2000 y PEI, respectivamente. Veinticuatro horas después de la sustitución del medio de transfección por un medio de GMP adecuado, por ejemplo X-Vivo 15 (Cambrex) o un medio químico definido como Pro293a (Cambrex) sin suero. Las células HEK293T transfectadas productoras de anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLD18 se cultivaron durante 96 horas adicionales. Se recolectaron los sobrenadantes crudos, se esterilizaron mediante filtración y se purificaron mediante proteína A-sefariosa. Se determinó la concentración de anticuerpos mediante ensayo de BCA y se comprobó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción de Coomassie.

#### c. Características de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos clonados y generados contra CLD18A2 se analizó mediante citometría de flujo tal como se indica en el Ejemplo 3. Se incubaron durante 30 minutos a 4°C células HEK293 vivas establemente expresantes de CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) y células HEK293 establemente expresantes de CLD18A1 humano (SEC ID nº 7, nº 8) (HEK293-CLD18A1), con sobrenadantes de cultivo purificado de células HEK293T que contenían anticuerpos monoclonales quiméricos, seguido de la incubación con anticuerpo secundario fragmento F(ab)<sub>2</sub> de cabra conjugado con APC anti-Fcγ de IgG humano y se contratiñó con YP. Se evaluó la unión mediante citometría de flujo utilizando un BD FACSArray.

De manera similar, se analizaron mediante citometría de flujo líneas celulares tumorales humanas expresantes endógenamente de CLD18A2, pro ejemplo células KATO-III y NUGC-4.

Las figs. 31A y B muestran análisis de citometría de flujo de los anticuerpos quiméricos ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10. Todos ellos muestran reconocimiento de epítomos nativos y muestran una unión específica y fuerte a células que expresan CLD18A2 pero no a células que expresan CLD18A1.

#### d. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Se preparó suero para la lisis mediada por el complemento, mediante extracción de sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer Serum-Monovette (Sarstedt, Nürnberg, Alemania), que seguidamente se centrifugaron a 600g durante 20 minutos. Se recolectó suero y se almacenó a -20°C. Se inactivó por calor suero de control a 56°C durante 30 minutos antes de almacenarlo.

Se analizaron anticuerpos quiméricos de la presente invención purificados mediante proteína A-sefarosa, para su capacidad de inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células KATO-III expresantes endógenamente de CLD18A2, así como células CHO-CLD18A2 establemente transfectadas. Las células se incubaron con los anticuerpos monoclonales ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10, respectivamente, a una concentración final de 2,5 µg/ml a 35 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Se añadió suero humano al 20% en RPMI a las células y se incubaron durante 30 minutos adicionales a 37°C. A continuación, se discriminaron las células vivas y las células muertas mediante tinción con YP a una concentración final de 2,5 µg/ml y se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de lisis celular mediada por anticuerpos. Para el análisis de citometría de flujo, se utilizó un citómetro de flujo BD FACSAarray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recolectaron por lo menos 10.000 sucesos para el análisis, excluyendo los residuos celulares mediante ajuste del umbral de dispersión frontal-lateral (FSC/SSC). Se calculó la lisis específica mediante la fórmula siguiente: lisis específica = (% de células YP-positivas en la muestra - % de células YP-positivas en la muestra con suero inactivado por calor). Se demostró la lisis específica mediada por CDC con varios anticuerpos. La totalidad de los tres anticuerpos medió en una CDC robusta en células CHO-CLD18A2 (figura 32). En las células KATO-III, los anticuerpos ch-163E12 y ch-175D10 eran inductores de una CDC robusta.

#### e. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se analizaron anticuerpos quiméricos purificados mediante FPLC de la invención para su capacidad de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células KATO-III expresantes endógenamente de CLD18A2 humano.

Se diluyó sangre humana de donantes sanos dos veces en tampón fosfato (PBS) y se depositaron capas de células sanguíneas sobre Ficoll (1.077 g/ml, Pharmacia). Tras la centrifugación, se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo X-Vivo-15 suplementado con suero humano al 5% inactivado por calor.

Quince horas antes del ensayo, se transfectaron células KATO-III con luciferasa y se sembraron  $5 \times 10^4$  células/pocillo en una microplaca blanca.

Para el ensayo, se añadieron células efectoras (PBMC, preparadas tal como se ha indicado anteriormente) a una proporción de células efectoras a células diana (E:D) de 20:1 y anticuerpos quiméricos purificados mediante FPLC, y se incubaron durante 2-3 horas a 37°C, con 5% de CO<sub>2</sub>. La concentración final del anticuerpo en el pocillo era de 50 µg/ml. Tras 2-3 horas de preincubación, se añadió amarillo lucifer (BD Biosciences, San Jose, USA) a una concentración de 1 mg/ml. Se midió continuamente la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer por la luciferasa de las células viables, durante un máximo de 6 horas utilizando un lector de microplacas (Infinite200, Tecan, Suiza). Se calculó el porcentaje de citotoxicidad celular utilizando la fórmula siguiente: % de lisis específica =  $100 - ((\text{pulsos de luminiscencia de la muestra} - \text{pulsos de luminiscencia espontánea}) / (\text{pulsos de luminiscencia máxima} - \text{pulsos de luminiscencia máxima})) \times 100$ , determinando la luminiscencia espontánea mediante la adición de Triton X-100 (concentración final de 0,2%) y se midió la señal máxima en ausencia de anticuerpos.

Utilizando dicho ensayo se demostró que los anticuerpos monoclonales ch-163E12 y ch-175D10 mediaron en una fuerte ADCC sobre las células KATO-III (fig. 33).

#### f. Inhibición de la proliferación

Se analizaron anticuerpos quiméricos purificados mediante FPLC de la invención para su capacidad de inhibir el crecimiento celular de células KATO-III expresantes endógenamente de CLD18A2 humano.

Se cultivaron células diana (KATO-III) en presencia de los anticuerpos quiméricos respectivos (ver inhibición de la proliferación con anticuerpos murinos, Ejemplo 7). Se demostró que los anticuerpos quiméricos purificados mediante FLPC ch-163E12 y ch-166E2 inhibieron la proliferación celular.

### 10. Selección de anticuerpos como candidatos a desarrollo clínico

Los compuestos candidatos a desarrollo clínico ideales cubren un amplio abanico de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas (ver también la sección IV - Usos y métodos de la invención). Según la invención, se proporcionan anticuerpos con diana en CLD18-A2. Se demuestra que los anticuerpos proporcionados según la invención ofrecen un amplio espectro de propiedades referentes a la especificidad, capacidad de inducir CDC y ADCC e inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18, en particular células tumorales. Además, se ha demostrado que la quimerización de los anticuerpos puede conducir a la adquisición de funciones efectoras dependientes de Fc adicionales no presentes en la molécula murina parental. Por ejemplo, se muestra en la presente memoria que el anticuerpo 175D10 con IgG1 murina no induce citotoxicidad dependiente del complemento (ver el Ejemplo 5), mientras que ch-175D10 con IgG1 humana induce lisis específica de las células tumorales expresantes constitutivamente de CLD18 (ver las Tab. 5 y 6).

Los anticuerpos proporcionados según la presente invención pueden clasificarse en diferentes clases según sus propiedades de unión y su capacidad de mediar en funciones efectoras sobre células que expresan CLD18. De entre los anticuerpos proporcionados según la presente invención pueden seleccionarse candidatos a desarrollo clínico basándose en sus características funcionales. Se proporciona una vista general de las propiedades para anticuerpos murinos y quiméricos seleccionados de la invención en las Tab. 5 y 6, respectivamente.

Los candidatos a desarrollo clínico de la invención pueden presentar una o más de las propiedades siguientes:

- a) unión a CLD18A2 humano pero no a CLD18A1 humano (por ejemplo 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10). Para ejemplos ver las figuras 6A y 6B.
- b) Unión a CLD18A2 de ratón pero no a CLD18A1 de ratón (por ejemplo 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos ver las figuras 15A y 15B.
- c) Unión a CLD18 expresado naturalmente por células tumorales (por ejemplo 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-45C1, ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10). Para ejemplos ver la figura 13.
- d) Unión a CLD18 en zonas de contacto intercelular (por ejemplo 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos ver las figuras 12A y 12B.
- e) Mediación en la eliminación inducida por CDC de células que expresan CLD18 (por ejemplo 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-163E12 y ch-175D10). Para ejemplos ver la figura 32.
- f) Mediación en la eliminación inducida por ADCC de células que expresan CLD18 (por ejemplo ch-163E12 y ch-175D10). Para ejemplos ver la figura 33.
- g) Inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18 (por ejemplo 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-163E12 y ch-166E2).
- h) Inhibición del crecimiento tumoral en modelos de xenoinjerto con células que expresan CLD18 (por ejemplo 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos ver la figura 24.
- i) Prolongación de la supervivencia en modelos de xenoinjerto con células que expresan CLD18 (por ejemplo 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos ver la figura 25B.

Vista general ejemplificativa de propiedades para la selección de candidatos a desarrollo clínico

**Tabla 5: anticuerpos murinos**

Anticuerpo	Unión de CLD18A2 humano pero no CLD18A1	Unión de CLD18A2 de ratón pero no CLD18A1	Unión de CLD18 sobre células tumorales naturalmente expresantes	Unión a CLD18 en zonas de contacto	Mediación de CDC sobre células expresantes de CLD18	Inhibición de la proliferación de células expresantes de CLD18	Inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjertos expresantes de CLD18	Prolongación de la supervivencia en xenoinjertos expresantes de CLD18
45C1	+	-	+	+	(+)	+	(+)	(+)
125E1	+	+	+	+	(+)	+	+	+
163E12	+	+	+	+	+	+	+	+
175D10	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+

leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes diseños

**Tabla 6: anticuerpos quiméricos**

Anticuerpo	Unión de CLD18A2 humano pero no a CLD18A1	Unión de CLD18 sobre células tumorales naturalmente expresantes	Mediación de CDC sobre células expresantes de CLD18	Mediación de ADCC sobre células expresantes de CLD18	Inhibición de la proliferación de células expresantes de CLD18
ch-45C1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.

ch-125E1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-163E12	+	+	+	+	+
ch-175D10	+	+	+	+	n.d.

leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes diseños, n.d. no realizado

**Hoja adicional para material biológico**

5

Identificación de otros depósitos:

10

- 1) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748) son:

15

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
Mascheroder Weg 1b  
38124 Braunschweig  
DE

20

- 2) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos (DSM ACC2808, DSM ACC2809, DSM ACC2810) son:

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH  
Inhoffenstr. 7 B  
38124 Braunschweig  
DE

Fecha de los depósitos	Números de acceso	Las indicaciones realizadas a continuación se refieren al microorganismo depositado en la descripción en las páginas siguientes
19 de octubre, 2005	DSM ACC2738	página 16, línea 34
19 de octubre, 2005	DSM ACC2739	página 17, línea 1
19 de octubre, 2005	DSM ACC2740	página 17, línea 2
19 de octubre, 2005	DSM ACC2741	página 17, línea 3
19 de octubre, 2005	DSM ACC2742	página 17, línea 4
19 de octubre, 2005	DSM ACC2743	página 17, línea 5
17 de noviembre, 2005	DSM ACC2745	página 17, línea 6
17 de noviembre, 2005	DSM ACC2746	página 17, línea 7
17 de noviembre, 2005	DSM ACC2747	página 17, línea 8
17 de noviembre, 2005	DSM ACC2748	página 17, línea 9
26 de octubre, 2006	DSM ACC2808	página 17, línea 10
26 de octubre, 2006	DSM ACC2809	página 17, línea 11
26 de octubre, 2006	DSM ACC2810	página 17, línea 12

25

Indicaciones adicionales para la totalidad de los depósitos mencionados anteriormente:

30

- mieloma de ratón (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fusionado con esplenocitos de ratón (Mus musculus)
- hibridoma que secreta anticuerpo contra la claudina-18A2 humana

- 3) Depositante:

La totalidad de los depósitos mencionados anteriormente fueron realizados por:

35

Ganymed Pharmaceuticals AG  
Freiligrathstraße 12  
55131 Mainz  
DE

40

**Listado de secuencias**

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG

45

<120> Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento del cáncer

ES 2 555 979 T3

<130> 342-31 EPT4

<150> EP 05 025 657.7

<151> 2005-11-24

5

<160> 150

<170> PatentIn versión 3.3

10

<210> 1

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 1

```

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtgggtt cactgattgg gattgcgggc      60
atcattgtcg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtacaa caaccccgta      120
acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc      180
accgagtgcc ggggtactt caccctgctg gggctgccag ccattgctga ggcagtgcga      240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctgggtatc catctttgcc      300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc      360
tcgggatca tgttcattgt ctcaggctct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc      420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg      480
atggtgcaga ctggtcagac caggtacaca ttggtgcgg ctctgttctg gggctgggtc      540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca      600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct cggggcacag tgttgcctac      660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata      720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat      780
gtgtaa                                          786
    
```

20

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25

<400> 2

```

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
                20                25                30
    
```

ES 2 555 979 T3

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly  
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val  
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser  
 100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val  
 260

- <210> 3
- 5 <211> 816
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
  
- <400> 3
- 10

ES 2 555 979 T3

```

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgctggc   60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caaccccgta   120
acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc   180
accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcga   240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctgggtatc catctttgcc   300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc   360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc   420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtgaa   480
caaaaactca tctcagaaga ggatctgggg atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca   540
tttggtgctg ctctgttcgt gggctgggtc gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg   600
atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct   660
tatcatgcct cgggccacag tgttgcttac aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc   720
tttgggtcca acacaaaaa caagaagata tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag   780
gtacaatctt atccttccaa gcacgactat gtgtaa                               816

```

<210> 4  
 <211> 271  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20           25           30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35           40           45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50           55           60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg
 65           70           75           80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val
 85           90           95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser

```

10

ES 2 555 979 T3

100	105	110
Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser 115	120	125
Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val 130	135	140
Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Glu 145	150	155
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Met Val Gln Thr Val Gln 165	170	175
Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly 180	185	190
Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly 195	200	205
Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser 210	215	220
Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly 225	230	235
Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg 245	250	255
Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val 260	265	270

<210> 5  
 <211> 813  
 5 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5

```

atggcctgga ctgcctgtca gggcttgggg ttctgtggtt cactgattgg gattgctggc 60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtataa caaccccgta 120
acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgtctctgtg tccgagagag ctctggcttc 180
accgagtgcc ggggctactt caccctgtac ccatacgacg tgccagacta cgcactgggg 240
ctgccagcca tgctgcaggc agtgcgagcc ctgatgatcg taggcatcgt cctgggtgcc 300
attgacctcc tggatccat ctttgccctg aaatgcatcc gcattggcag catggaggac 360
tctgccaag ccaacatgac actgacctcc gggatcatgt tcattgtctc aggtctttgt 420
gcaattgctg gagtgtctgt gtttgccaac atgctggtga ctaacttctg gatgtccaca 480
gctaacatgt acaccggcat ggggtgggatg gtgcagactg ttcagaccag gtacacattt 540
gggtgcggctc tgttcgtggg ctgggtcgct ggaggcctca cactaattgg ggggtgtgat 600
atgtgcatcg cctgccgggg cctggcacca gaagaaacca actacaagc cgtttcttat 660
catgcctcgg gccacagtgt tgctacaag cctggaggct tcaaggccag cactggcttt 720
gggtccaaca ccaaaaacaa gaagatatac gatggagggtg cccgcacaga ggacgaggta 780
caatcttate cttccaagca cgactatgtg taa 813
    
```

10

ES 2 555 979 T3

<210> 6  
 <211> 270  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

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

Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20           25           30

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly
 35           40           45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg
 50           55           60

Gly Tyr Phe Thr Leu Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Leu Gly
 65           70           75           80

Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile
 85           90           95

Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys
 100          105          110

Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu
 115          120          125

Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly
 130          135          140

Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr
 145          150          155          160

Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr
 165          170          175
Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly
 180          185          190

Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu
 195          200          205

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

His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe
 225          230          235          240

Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr
 245          250          255

Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser Lys His Asp Tyr Val
 260          265          270
    
```

10

<210> 7  
 <211> 786  
 <212> ADN

ES 2 555 979 T3

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgtccacca	ccacatgcca	agtgggtggcg	ttcctcctgt	ccatcctggg	gctggccggc	60
tgcacgcg	ccaccgggat	ggacatgtgg	agcaccagg	acctgtacga	caaccccgtc	120
acctccgtgt	tccagtacga	agggctctgg	aggagctg	tgaggcagag	ttcaggcttc	180
accgaatgca	ggccctattt	caccatcctg	ggacttccag	ccatgctgca	ggcagtgcga	240
gccctgatga	tcgtaggcat	cgctctgggt	gccattggcc	tcttggtatc	catctttgcc	300
ctgaaatgca	tccgcattgg	cagcatggag	gactctgcca	aagccaacat	gacactgacc	360
tccgggatca	tgttcattgt	ctcaggctct	tgtgcaattg	ctggagtgtc	tgtgtttgcc	420
aacatgctgg	tgactaactt	ctggatgtcc	acagctaaca	tgtacaccgg	catgggtggg	480
atggtgcaga	ctgttcagac	caggtacaca	tttgggtcgg	ctctgttcgt	gggctgggtc	540
gctggaggcc	tcacactaat	tgggggtgtg	atgatgtgca	tcgcctgccg	gggcctggca	600
ccagaagaaa	ccaactacaa	agccgtttct	tatcatgcct	caggccacag	tgttgcttac	660
aagcctggag	gcttcaaggc	cagcactggc	tttgggtcca	acaccaaaaa	caagaagata	720
tacgatggag	gtgcccgcac	agaggacgag	gtacaatctt	atccttccaa	gcacgactat	780
gtgtaa						786

5

<210> 8

<211> 261

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 555 979 T3

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

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr  
 20 25 30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser Val Phe Gln Tyr Glu Gly  
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Val  
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser  
 100 105 110

Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe Ile Val Ser  
 115 120 125

Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe  
 165 170 175

Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly Val Met Met  
 180 185 190

Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Ala Pro Glu Glu Thr Asn Tyr Lys Ala  
 195 200 205

Val Ser Tyr His Ala Ser Gly His Ser Val Ala Tyr Lys Pro Gly Gly  
 210 215 220

Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Lys Asn Lys Lys Ile  
 225 230 235 240

Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Glu Val Gln Ser Tyr Pro Ser  
 245 250 255

Lys His Asp Tyr Val  
 260

5 <210> 9  
 <211> 795  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

10 <400> 9

ES 2 555 979 T3

atggccacca ccacgtgcc a ggtggtaggg cttctcctgt ccctcctggg tctggccggc 60  
 tgcatagccg ccactgggat ggacatgtgg agcactcaag acctgtatga caaccagtc 120  
 accgccgtgt tccagtatga agggctctgg aggagttgag tgcaacagag ctcggggttc 180  
 accgagtgcc ggccatactt caccatcctg ggccttccag ccatgctgca agctgtacga 240  
 gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggta tcctcgtgtc catcttcgcc 300  
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360  
 tctgggatct tgttcatcat ctccggcacc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420  
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480  
 atgggtggca tgggtgcagac cgttcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540  
 ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600  
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660  
 gttgcctaca ggcctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720  
 aagaagatct acgatggggg tgccccacaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780  
 tatgactatg tgtag 795

<210> 10  
 <211> 795  
 <212> ADN  
 <213> Mus musculus

5

<400> 10

atgtcgggta ccgctgcc a gggcttgggg tttgtgggtg cactgatcgg gtttgcgggc 60  
 atcattgcag ccacttgtat ggaccagtgg agcaccagag atttatacaa caaccgggtg 120  
 accgctgtat tcaactacca agggctatgg cgttcatgag tccgagagag ctctggcttc 180  
 accgagtgcc gaggctactt caccctgttg gggttgccag ccatgctgca agctgtacga 240  
 gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggta tcctcgtgtc catcttcgcc 300  
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360  
 tctgggatct tgttcatcat ctccggcacc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420  
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480  
 atgggtggca tgggtgcagac cgttcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540  
 ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600  
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660  
 gttgcctaca ggcctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720  
 aagaagatct acgatggggg tgccccacaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780  
 tatgactatg tgtag 795

10

<210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

20

<400> 11  
 tggctctgtg tcgacactgt g

21

<210> 12

ES 2 555 979 T3

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

5 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 12  
 gtgtacatgt tagctgtgga c

21

10 <210> 13  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 13

```

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
 1          5          10          15

Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
          20          25          30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
          35          40          45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50          55
    
```

20 <210> 14  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
 1          5          10          15

Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
          20          25          30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
          35          40          45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
 50          55          60

Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
 65          70          75          80

Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
          85          90          95

Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
          100          105          110

Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
          115          120          125

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
          130          135          140

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
          145          150
    
```

25

ES 2 555 979 T3

<210> 15  
 <211> 390  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 15  
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60  
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaage ttggtaccga gctcggatcc 120  
 actccagtgt ggtggaatte tgcagatggc cgcattggacc agtggagcac ccaagacttg 180  
 tacaacaacc ccgtaacage tgttttcaac taccaggggc tgtggegctc ctgtgtccga 240  
 gagagctctg gcttcaccga gtgccggggc tacttcaccc tgcctggggct gccagccatg 300  
 ctgcaggcag tgcgagcggc catccagcac agtggcggcc gctcagaggag ggcccgaaca 360  
 aaaactcadc tcagaagagg atctgaatag 390

<210> 16  
 <211> 129  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 16  
 Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
 1 5 10 15  
 Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr  
 20 25 30  
 Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala  
 35 40 45  
 Asp Gly Arg Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro  
 50 55 60  
 Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg  
 65 70 75 80  
 Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly  
 85 90 95  
 Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Ala Ile Gln His Ser Gly  
 100 105 110  
 Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys Thr His Leu Arg Arg Gly Ser  
 115 120 125

15

Glu

<210> 17  
 <211> 411  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 17

ES 2 555 979 T3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgetct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc      120
actccagtgt ggtggaattc tgcagatggc cgcgcctga tgatcgtagg catcgtcctg      180
ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gccctgaaat gcatccgcat tggcagcatg      240
gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acatccggga tcatgttcat tgtctcaggt      300
ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacgcgg ccatccagca cagtggcggc      360
cgctcgagga gggcccgaac aaaaactcat ctcagaagag gatctgaata g              411

```

<210> 18  
 <211> 136  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 18

```

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

Gly Ser Thr Gly Asp Ala Ala Gln Pro Ala Arg Arg Ala Arg Arg Thr
          20          25          30

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala
          35          40          45

Asp Gly Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly
 50          55          60

Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met
 65          70          75          80

Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe
          85          90          95

Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn
          100          105          110

Ala Ala Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys
          115          120          125

Thr His Leu Arg Arg Gly Ser Glu
          130          135

```

10

<210> 19  
 <211> 531  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 19

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgetct gggttccagg ttccactggt      60
gacgcggccc agccggccag gcgcgccatg gaccagtgga gcacccaaga cttgtacaac      120
aaccccgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc      180
tctggettca ccgagtgccg gggctacttc accctgetgg ggctgccagc catgctgcag      240
gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcacc gtccctgggtg ccattggcct cctggtatcc      300
atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcca agccaacatg      360
acactgacct ccgggatecat gttcattgtc tcaggctctt gtgcaattgc tggagtgtct      420
gtgtttgcca acatgctggg gactaacttc tggatgtcca cagetaacat gtacaccggc      480

```

ES 2 555 979 T3

<210> 20  
 <211> 176  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 20

```

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

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

Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn
          35          40          45

Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
          50          55          60

Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln
 65          70          75          80

Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Ala Ile Gly
          85          90          95

Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met
          100          105          110

Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Met Phe
          115          120          125

Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val Phe Ala Asn
          130          135          140

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

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala
          165          170          175
    
```

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

10

<400> 21

```

Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn
 1          5          10
    
```

15

<210> 22  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

20

<400> 22

```

Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln
 1          5          10
    
```

25

<210> 23  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

30

<400> 23

ES 2 555 979 T3

Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe  
 1 5 10

<210> 24  
 <211> 12  
 5 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro  
 1 5 10

10 <210> 25  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15 <400> 25

Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala  
 1 5 10

20 <210> 26  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly  
 1 5 10

25 <210> 27  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 30 <213> Homo sapiens

<400> 27

Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile  
 1 5 10

35 <210> 28  
 <211> 55  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

40 <400> 28

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala  
 1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser  
 20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala  
 35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala  
 50 55

<210> 29  
 <211> 24  
 45 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 29

ES 2 555 979 T3

Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys  
 1 5 10 15

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly  
 20

---

<210> 30  
 <211> 40  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 30

Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr  
 1 5 10 15

Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe  
 20 25 30

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
 35 40

---

10

<210> 31  
 <211> 153  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

15

<400> 31

Met Asp Gln Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala  
 1 5 10 15

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser  
 20 25 30

Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala  
 35 40 45

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly  
 50 55 60

Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile  
 65 70 75 80

Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly  
 85 90 95

Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val  
 100 105 110

Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met  
 115 120 125

Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr  
 130 135 140

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp  
 145 150

---

<210> 32  
 <211> 3359  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

20

ES 2 555 979 T3

<400> 32

cacaccttcg gcagcaggag ggcggcagct tctcgcaggc ggcagggcgg gcggccagga 60  
tcatgtccac caccacatgc caagtggtag cgttcctcct gtccatcctg gggctggccg 120  
gctgcacgc gccaccggg atggacatgt ggagcaccca ggacctgtac gacaaccccg 180  
tcacctcctg gttccagtac gaagggctct ggaggagctg cgtgaggcag agttcaggct 240  
tcaccgaatg caggccctat ttcaccatcc tgggacttcc agccatgctg caggcagtg 300  
gagccctgat gatcgtaggc atcgtcctgg gtgccattgg cctcctggta tccatctttg 360  
ccctgaaatg catccgcatg ggcagcatgg aggactctgc caaagccaac atgacactga 420  
cctccgggat catgttcatt gtctcaggtc tttgtgcaat tgctggagtg tctgtgtttg 480  
ccaacatgct ggtgactaac ttctggatgt ccacagctaa catgtacacc ggcattgggtg 540  
ggatggtgca gactgttcag accaggtaga catttggtag ggctctgttc gtgggctggg 600  
tcgctggagg cctcacacta attgggggtg tgatgatgtg catcgcctgc cggggcctgg 660  
caccagaaga aaccaactac aaagccgttt cttatcatgc ctcaggccac agtgttgctt 720  
acaagcctgg aggttcaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaa aacaagaaga 780  
tatacgatgg aggtgcccgc acagaggacg aggtacaatc ttatccttcc aagcacgact 840  
atgtgtaatg ctctaagacc tctcagcagc ggcggaagaa actccccggag agctcaccca 900  
aaaaacaagg agatcccatc tagatttctt cttgcttttg actcacagct ggaagttaga 960  
aaagcctcga tttcatcttt ggagaggcca aatggcttta gcctcagtct ctgtctctaa 1020  
atattccacc ataaaacagc tgagttatct atgaattaga ggctatagct cacatcttca 1080  
atcctctatt tcttttttta aatataactt tctactctga tgagagaatg tggttttaa 1140  
ctctctctca cattttgatg atttagacag actccccctc ttcctcctag tcaataaacc 1200  
cattgatgat ctatttccca gcttatcccc aagaaaactt ttgaaaggaa agagtagacc 1260  
caaagatggt attttctgct gtttgaatct tgtctcccca cccccaactt ggctagtaat 1320  
aaacacttac tgaagaagaa gcaataagag aaagatattt gtaatctctc cagcccatga 1380  
tctcggtttt cttacactgt gatcttataa gttaccaaac caaagtcatt ttcagtttga 1440  
ggcaaccaa cctttctact gctgttgaca tcttcttatt acagcaacac cattctagga 1500  
gtttctgtag ctctccactg gagtccctct tctgtcgcgg gtcagaaatt gtccttagat 1560  
gaatgagaaa attatttttt ttaatttaag tcctaaatat agttaaata aataatgttt 1620  
tagtaaaatg atacactatc tctgtgaaat agcctcacc ctacatgtgg atagaaggaa 1680  
atgaaaaaat aattgctttg acattgtcta tatggtactt tgtaaagtca tgcttaagta 1740  
caaattccat gaaaagctca ctgatcctaa tcttttccct ttgaggtctc tatggctctg 1800  
attgtacatg atagtaagtg taagccatgt aaaaagtaaa taatgtctgg gcacagtggc 1860  
tcacgcctgt aatcctagca ctttgggagg ctgaggagga aggatcactt gagcccagaa 1920  
gttcgagact agcctgggca acatggagaa gccctgtctc taaaaaatac agagagaaaa 1980  
aatcagccag tcatggtggc ctacacctgt agtcccagca ttccgggagg ctgaggtggg 2040  
aggatcactt gagcccaggg aggttggggc tgcagtgagc catgatcaca cactgcaact 2100  
ccagccaggt gacatagcga gatcctgtct aaaaaataa aaaaataata atggaacaca 2160  
gcaagtccca ggaagttagt taaaactaat tctttaaaaa aaaaaaaaag ttgagcctga 2220  
attaaatgta atgtttccaa gtgacaggta tccacatttg catggttaca agccactgcc 2280  
agtttagcagt agcactttcc tggcactgtg gtcggttttg ttttgttttg ctttgtttag 2340

ES 2 555 979 T3

agacggggtc tcactttcca ggctggcctc aaactcctgc actcaagcaa ttcttctacc 2400  
ctggcctccc aagtagctgg aattacaggt gtgcgccatc acaactagct ggtggtcagt 2460  
tttgttactc tgagagctgt tcacttctct gaattcacct agagtggttg gaccatcaga 2520  
tgtttgggca aaactgaaag ctctttgcaa ccacacacct tccctgagct tacatcactg 2580  
cccttttgag cagaaagtct aaattccttc caagacagta gaattccatc ccagtaccaa 2640  
agccagatag gccccctagg aaactgaggt aagagcagtc tctaaaaact acccacagca 2700  
gcattgggtgc aggggaactt ggccattagg ttattatttg agaggaaagt cctcacatca 2760  
atagtacata tgaaagtgac ctccaagggg attgggtgaat actcataagg atcttcaggc 2820  
tgaacagact atgtctgggg aaagaacgga ttatgcccc ttaataaaca agttgtgttc 2880  
aagagtcaga gcagtgagct cagaggccct tctcactgag acagcaacat ttaaaccaaa 2940  
ccagaggaag tatttgtgga actcactgcc tcagtttggg taaaggatga gcagacaagt 3000  
caactaaaga aaaaagaaaa gcaaggagga gggttgagca atctagagca tggagtttgt 3060  
taagtgtctc ctggatttga gttgaagagc atccatttga gttgaaggcc acagggcaca 3120  
atgagctctc ccttctacca ccagaaagtc cctggtcagg tctcaggtag tgcggtgtgg 3180  
ctcagctggg tttttaatta gcgcattctc tatccaacat ttaattgttt gaagcctcc 3240  
atatagttag attgtgcttt gtaattttgt tgttgttgc ctatcttatt gtatatgcat 3300  
tgagtattaa cctgaatggt ttgttactta aatattaaa acactgttat cctacagtt 3359

<210> 33  
<211> 849  
<212> ADN  
5 <213> Mus musculus

<400> 33

gagaacctgc ctgtctcttg tccctcccat ttgtgtggac tctgtgctcc atcatgtcgg 60  
tgaccgcctg ccagggcttg gggtttgtgg tgtcactgat cgggtttgcg ggcattctg 120  
cagccacttg tatggaccag tggagcacc aggatttata caacaaccg gtgaccgctg 180  
tattcaacta ccaagggcta tggcgttcat gcgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240  
gccgaggeta cttcaccctg ttgggggtgc cagccatgct gcaagctgta cgagccctga 300  
tgatecgtgg cattgtctg ggggtcatcg gtatcctcgt gtccatcttc gccctgaagt 360  
gcattcgcac tggtagcatg gatgactctg ccaaggccaa gatgactctg acttctggga 420  
tcttgttcat catctcggc atctgtgcaa tcattggtgt gtctgtgttt gccaacatgc 480  
tggtgaccaa cttctggatg tccacagcta acatgtacag cggcatgggc ggcatgggtg 540  
gcatgggtga gaccgttcag accaggtaca ccttcgggtg agctctgttc gtgggctggg 600  
ttgctggagg cctcaccctg attgggggag tgatgatgtg catcgctgc cgtggcctga 660  
caccagatga cagcaacttc aaagctgtgt cttaccatgc ctctggccaa aatgttgctt 720  
acaggcctgg aggccttaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaga aacaagaaga 780  
tctacgatgg ggggtcccg acagaagagc atgaacagtc tcatcctacc aagtatgact 840  
atgtgtagt 849

10 <210> 34  
<211> 3350  
<212> ADN  
<213> Mus musculus

15 <400> 34

ES 2 555 979 T3

agaattgcbc tgtccacttg tegtgtggct ctgtgtcgac actgtgcbcc accatggccg 60  
 tgactgcctg tcagggcttg gggttcgtgg tttcactgat tgggattgcb ggcacattg 120  
 ctgccacctg catggaccag tggagcacc aagacttgta caacaacccc gtaacagctg 180  
 ttttcaacta ccaggggctg tggcgtcctt gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240  
 gccggggcta cttcaccctg ctggggctgc cagccatgct gcagggcagt cgagccctga 300  
 tgatcgtagg catcgtcctg ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gcctgaaat 360  
 gcatccgcat tggcagcatg gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acctccggga 420  
 tcatgttcat tgtctcaggt ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacatgc 480  
 tggtgactaa cttctggatg tccacageta acatgtacac cggcatgggt gggatggtgc 540  
 agactgttca gaccaggtac acatttggtg cggtctgtt cgtgggctgg gtcgctggag 600  
 gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcatcgctg ccggggcctg gcaccagaag 660  
 aaaccaacta caaagccgtt tcttatcatg cctcaggcca cagtgttgcc tacaagcctg 720  
 gaggttcaa ggccagcact ggctttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacgatg 780  
 gaggtgcccc cacagaggac gaggtacaat cttatccttc caagcacgac tatgtgtaat 840  
 gctctaagac ctctcagcac gggcgggaaga aactcccga gagctcacc aaaaaacaag 900  
 gagatcccat ctagatttct tcttgctttt gactcacagc tggaagttag aaaagcctcg 960  
 atttcatctt tggagaggcc aaatggtctt agcctcagtc tctgtctcta aatattccac 1020  
 cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggctatagc tcacatttcc aatcctctat 1080  
 ttcttttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtggttttaa tctctctctc 1140  
 acattttgat gatttagaca gactccccct cttcctccta gtcaataaac ccattgatga 1200  
 tctatttccc agcttatccc caagaaaact tttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt 1260  
 tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc acccccact tggctagtaa taaacactta 1320  
 ctgaagaaga agcaataaga gaaagatatt tgtaatctct ccagcccatg atctcggttt 1380  
 tcttacactg tgatcttaaa agttaccaaa ccaaagtcac tttcagtttg aggcaaccaa 1440  
 accttctac tgetgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttctga 1500

ES 2 555 979 T3

gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggtcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa 1560  
aattatTTTT ttttaatttaa gtccctaaata tagttaaAAT aaataatgTt ttagtAAAAT 1620  
gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgAAAAAA 1680  
taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaattcca 1740  
tgaaaagctc actgatccta attccttccc tttgaggctc ctatggctct gattgtacat 1800  
gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataatgtctg ggcacagtgg ctcacgctg 1860  
taatcctagc actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttcgagac 1920  
tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aaatcagcca 1980  
gtcatggTgg cctacacctg tagtcccagc attccgggag gctgaggTgg gaggatcact 2040  
tgagcccagg gaggttgggg ctgcagtgag ccatgatcac accactgcac tccagccagg 2100  
tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaataaat aatggaacac agcaagtctc 2160  
aggaagtagg ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt 2220  
aatgtttcca agtgacaggt atccacattt gcatggttac aagccactgc cagttagcag 2280  
tagcactttc ctggcactgt ggtcggtttt gttttgtttt gctttgttta gagacggggt 2340  
ctcactttcc aggctggcct caaactcctg cactcaagca attctcttac cctggcctcc 2400  
caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tggTggTcag tttgttact 2460  
ctgagagctg ttcacttctc tgaattcacc tagagtgtt ggaccatcag atgtttgggc 2520  
aaaactgaaa gctctttgca accacacacc ttccctgagc ttacatcact gcccttttga 2580  
gcagaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat cccagtacca aagccagata 2640  
ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacagc agcattggtg 2700  
caggggaact tggccattag gttattattt gagaggaag tcctcacatc aatagtacat 2760  
atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac 2820  
tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagtTgtgtt caagagtcag 2880  
agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaaccAA accagaggaa 2940  
gtatttgtgg aactcactgc ctCagttTgg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag 3000  
aaaaaagaaa agcaaggagg agggTtgagc aatctagagc atggagTttg ttaagtGctc 3060  
tctggattTg agttgaagag catccattTg agttgaaggc cacaggGcac aatgagctct 3120  
ccctctacc accagaaagt ccctggtcag gtctcaggta gtgcggTgtg gctcagctgg 3180  
gttttttaatt agcgcattct ctatccaaca ttttaattgtt tgaaagcctc catatagtta 3240  
gattgtgctt tgtaattttg ttgttTgtgc tctatcttat tgtatatgca ttgagtatta 3300  
acctgaatgt tttgttactt aaatattaaa aacactgtta tcctacagtt 3350

<210> 35  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> Mus musculus

5

<400> 35

ES 2 555 979 T3

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

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

Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly  
 35 40 45

Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60

Gly Tyr Phe Thr Leu Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val  
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser  
 100 105 110

Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser  
 115 120 125

Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala  
 165 170 175

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly  
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn  
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg  
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn  
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser  
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val  
 260

- <210> 36
- 5 <211> 2786
- <212> ADN
- <213> Mus musculus
- <400> 36

ES 2 555 979 T3

ggccgggaac cttcccagca agaggggtgt ggttgctcct ggaagcctgc gcccagcagc 60  
 tgaagccatg gccaccacca cgtgccaggt ggtagggctt ctectgtccc tcctgggtct 120  
 ggccggctgc atagccgcca ctgggatgga catgtggagc actcaagacc tgtatgacaa 180  
 cccagtcacc gccgtgttcc agtatgaagg gctctggagg agttgcgtgc aacagagctc 240  
 ggggttcacc gagtgccggc catacttcac catcctgggc cttccagcca tgctgcaagc 300  
 tgtacgagcc ctgatgatcg tgggcattgt tctgggggtc atcggtatcc tcgtgtccat 360  
 cttcgcctcg aagtgcattc gcattggtag catggatgac tctgccaagg ccaagatgac 420  
 tctgacttct gggatcttgt tcatcatctc cggcatctgt gcaatcattg gtgtgtctgt 480  
 gtttgccaac atgctggtga ccaactctg gatgtccaca gctaacatgt acagcggcat 540  
 gggcggcatg ggtggcatgg tgcagaccgt tcagaccagg tacacctcg gtgcagctct 600  
 gttcgtgggc tgggttgctg gaggcctcac cctgattggg ggagtgatga tgtgcatcgc 660  
 ctgccgtggc ctgacaccag atgacagcaa cttcaaagct gtgtcttacc atgcctctgg 720  
 ccaaaatggt gcctacagge ctggaggctt taaggccagc actggccttg ggtccaacac 780  
 cagaaacaag aagatctacg atgggggtgc ccgcacagaa gacgatgaac agtctcatcc 840  
 taccaagtat gactatgtgt agtgctctaa gaccgccea cctgtgtgca ggaggaacct 900  
 ttcccaaga agagctcacc ccaaagcaac gggagtctac cttgttccct tgttgatttc 960  
 aactgacatc tgaaagtgg taaagcctga ttttcatcca tagggaggct agacagtctt 1020  
 ggcacatgt gtctgcctct aaatatccca tcacaaaaca gctgagttat cgtttatgag 1080  
 ttagaggcca taacactcac tttagcccaa ccctctgctt tttaccgtag actttctttt 1140  
 catctggtga tggaatggaa tttgactcac agactaatac tttaatgggt tagagaaact 1200  
 ttcttctcct gtacttaata agcctgctga tggtegattt tccagcttga ccaccaaggg 1260  
 aaattttaaa aggaaaaaaa aatacattaa aaggcattat ttctactca attgtgcctt 1320  
 acccaccccc aacttgactg ataataataa tgaacaccac ttaaagaaag aatgccagag 1380  
 gaaagatagt tgtgttctcc cccagccagt catctgagtc ccctatgtg gtgatctaga 1440

ES 2 555 979 T3

```

acattactcg ccacagtgat tttcaaagaa ggcaagcgag cctgttcgct ctgctcagca 1500
tctgctgatt ccagcaagge ccttccagag ctttccacta gaagtcctcc ttctctcgga 1560
agtcagaaat tccccctaga agagtaagaa atagattcct ttgggtaacc tgagtcctag 1620
gtatagttat aataaatagt atattagcaa aacggtttgg tatctcagtg aattagtttc 1680
agccttacat atagaaaaag ctggggaaaa aaaaagcatc ccttgacatt gtctatagcg 1740
taagatccta tataaatcca agcttcaaca aaagctcact gagtctaata gttttctttt 1800
gaggctccca cggccttagt actcatagat gcagcccctg tttaaaagta aaaaaattaa 1860
agtagcttaa aacgggttct tttttttttt ttttttttca aaaaatccaa tagagacctg 1920
tgtgtctggc atagctacag ttactgcaa tcgacagggc cacttctttg gtctcttagg 1980
cagttttgca gttctgacag ctgcgccggg catcaatag cagaccacac ccttctctgt 2040
gctttagga cgaccgctc aaggagaaag catgaactcc atctccatgt gagcctgaat 2100
gctcccagga aatggagata ggggtgctct caaaaccac ctgaacctga aacagctgta 2160
gcgctatgct gtaagagcct ggccatcaag ttcctatgga gaaaagggc agtccttgca 2220
ttaatagtgc atatataagt ggcctctggg gggcagggat gaatattcag tgggtggctcc 2280
gagtatgtac agaccgtcta aggagctgtg ttgaccaaga gccagggtta tacgcagagt 2340
ttttccact gggactacag tgattttaga ctatactgaa gaaggccctc tggaaaatca 2400
ttatctgaaa tggcataaag aatgaacaga ccaaacaatt taaggggagg gggcaggtgg 2460
aaggaggggg aaggaggtag aaataagaat ctagggcatg aagattgtta aggttcttgg 2520
ggtcctaatg gaaggtcacc cctttgagge catggacaca atgcaccca cccctacccc 2580
cacctgccc cccaccagaa agtccctggg cggactggag gcagtgagaa tcagctgttt 2640
tcagttagtg ggtctcggtg tagcacctgg ctgtttcaaa gottcccctt gctttgccgt 2700
ttttccgcc attgctgtct tgtttctgt gttattaacc tccatgtttt gtaogttaa 2760
tattaaaaca ctgttaacat ccattc 2786

```

<210> 37  
 <211> 264  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

5

<400> 37

```

Met Ala Thr Thr Thr Cys Gln Val Val Gly Leu Leu Leu Ser Leu Leu
 1           5           10           15

Gly Leu Ala Gly Cys Ile Ala Ala Thr Gly Met Asp Met Trp Ser Thr
 20           25           30

Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Gln Tyr Glu Gly
 35           40           45

```

ES 2 555 979 T3

Leu Trp Arg Ser Cys Val Gln Gln Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg  
 50 55 60

Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala Met Leu Gln Ala Val Arg  
 65 70 75 80

Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly Val Ile Gly Ile Leu Val  
 85 90 95

Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile Gly Ser Met Asp Asp Ser  
 100 105 110

Ala Lys Ala Lys Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile Leu Phe Ile Ile Ser  
 115 120 125

Gly Ile Cys Ala Ile Ile Gly Val Ser Val Phe Ala Asn Met Leu Val  
 130 135 140

Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Ser Gly Met Gly Gly  
 145 150 155 160

Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala  
 165 170 175

Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly Leu Thr Leu Ile Gly Gly  
 180 185 190

Val Met Met Cys Ile Ala Cys Arg Gly Leu Thr Pro Asp Asp Ser Asn  
 195 200 205

Phe Lys Ala Val Ser Tyr His Ala Ser Gly Gln Asn Val Ala Tyr Arg  
 210 215 220

Pro Gly Gly Phe Lys Ala Ser Thr Gly Phe Gly Ser Asn Thr Arg Asn  
 225 230 235 240

Lys Lys Ile Tyr Asp Gly Gly Ala Arg Thr Glu Asp Asp Glu Gln Ser  
 245 250 255

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val  
 260

<210> 38  
 <211> 40  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

10

<400> 38  
 gagaggatcc cgtacggtgg ctgcaccatc tgccttcac

40

<210> 39  
 <211> 37  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

20

<400> 39

gagagcggcc gcctaacct ctcccctgtt gaagctc

37

5 <210> 40  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

<400> 40

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac	60
ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct	
ggaactgcct ctggttggtg cctgctgaat	120
aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt	180
aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc	240
accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	
aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc	300
catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	
agcttcaaca ggggagagtg ttag	324

15 <210> 41  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 41

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

25 <210> 42  
 <211> 34  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

35 <400> 42  
 gagaaagctt tccaccaagg gcccatcggt cttc

34

<210> 43

ES 2 555 979 T3

	<211> 36		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
5	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido		
	<400> 43		
10	gagagcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag		36
	<210> 44		
	<211> 21		
	<212> ADN		
	<213> Artificial		
15	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido		
	<400> 44		
20	taccagttga actgacctc a		21
	<210> 45		
	<211> 981		
	<212> ADN		
25	<213> Artificial		
	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR		
30	<400> 45		
	ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc		60
	ctgggctgcc tggteaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc		120
	gccctgacca gggcgctgca caccttcccc gctgtcctac agtctcagg actctactcc		180
	ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac		240
	gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac		300
	aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc		360
	ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc		420
	gtgggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc		480
	gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt		540
	gtggtcagcg tctctaccgt cctgcaccag gactggtga atggcaagga gtacaagtgc		600
	aaggctctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg		660
	cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac		720
	caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtggtg		780
	gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac		840
	ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtgca gcaggggaac		900
	gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc		960
	tccctgtctc cgggtaaatg a		981
35	<210> 46		
	<211> 326		
	<212> PRT		
	<213> Artificial		
40	<220>		
	<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR		

ES 2 555 979 T3

<400> 46

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro  
20 25 30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr  
35 40 45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val  
50 55 60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn  
65 70 75 80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro  
85 90 95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

	<210> 47	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<220>	
10	<221> misc_feature	
	<222> 31 .. 32	
	<223> n e s a, c, g o t	
	<400> 47	
15	tttttttt tttttttt tttttttt nn	32
	<210> 48	
	<211> 30	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 48	
25	aagcagtgt atcaacgcag agtacgcggg	30
	<210> 49	
	<211> 26	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
35	<400> 49	
	ctgctactg gatggtggga agatgg	26
	<210> 50	
40	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 50	
	gggacagtca ctgagctgct cagag	25
50	<210> 51	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
55	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 51	
60	acaggggcca gtggatagac cgatg	25
	<210> 52	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
65	<220>	

	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 52	
5	agccagggac caagggatag acagatg	27
	<210> 53	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
10	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 53	
15	gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt	45
	<210> 54	
	<211> 22	
	<212> ADN	
20	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
25	<400> 54	
	gtaatacgac tcactatagg gc	22
	<210> 55	
	<211> 351	
30	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR	
35	<400> 55	
	caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata	60
	tcttgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg	120
	cctggacatg gccttgagt gattggagag attttacctg gaagtggtag tactaactac	180
	aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctcaa cacagcctac	240
	atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccctct attactgtgc aagatatgat	300
	taccctggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a	351
	<210> 56	
40	<211> 354	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
45	<223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR	
	<400> 56	
	cagatccagt tgggtgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc	60
	tcttgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggt	120
	ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aactggaga gccaacatat	180
	gctgaagagt tcaagggacg gtttgccctc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat	240
	ttgcagatca acaacctcaa aaatgaggac acggctacat atttctgtgc aagactgggt	300
	tttggtaatg ctatggacta ctggggctcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca	354

ES 2 555 979 T3

<210> 57  
 <211> 348  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR  
 <400> 57  
 caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ccggggcttc agtgaagctg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta caccttact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120  
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagtggtaa tacttactac 180  
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatcgtat 300  
 10 ggtgcctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctctca 348  
 <210> 58  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR  
 20 <400> 58  
 cagggtccaac tgcagcagcc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60  
 tcttgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg 120  
 cctggacaag gccttgagtg gatcggaat atttatcctt ctgatagtta tactaactac 180  
 aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaac aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatcgtgg 300  
 aggggtaact cctttgacta ctggggccaa ggcaccctc tcacagtctc ctca 354  
 <210> 59  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR  
 30 <400> 59  
 caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg 60  
 tcttgcaagg cttctggata cacattact gactatgta taagctgggt gaagcagaga 120  
 actggacagg gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagtggtag tacttactac 180  
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctcaa cacagcctac 240  
 atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggta 300  
 ttactacggg ctatggacta ctggggtaaa ggaacctcag tcacctctc ctca 354  
 <210> 60  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial  
 35  
 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR  
 40

ES 2 555 979 T3

<400> 60

caggttcacc	tacaacagtc	tggttctgaa	ctgaggagtc	ctgggtcttc	agtaaagctt	60
tcatgcaagg	atthttgattc	agaagtcctc	cctthttgctt	atatgagttg	gatttaggcag	120
aagcctgggc	atggatttga	atggattgga	gacatactcc	caagtattgg	tagaacaatc	180
tatggagaga	agthttgagga	caaagccaca	ctggatgcag	acacagtgtc	caacacagcc	240
tacttggagc	tcaacagtct	gacatctgag	gactctgcta	tctactactg	tgcaaggggg	300
gagggctacg	gtgcctgggt	tgcttactgg	ggccaagggg	ctctggtcac	tgtctctgca	360

5 <210> 61  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

<400> 61

gacattgtga	tgacacagtc	tccatcctcc	ctgactgtga	cagcaggaga	gaaggtcact	60
atgagctgca	agtccagtca	gagtctgtta	aacagtggaa	atcaaaagaa	ctacttgacc	120
tggtaccagc	agaaaccagg	gcagcctcct	aaactgttga	tctactgggc	atccactagg	180
gaatctgggg	tcctgatcg	cttcacaggc	agtggatctg	gaacagattt	cactctcacc	240
atcagcagtg	tcagagctga	agacctggca	gtttattact	gtcagaatga	ttatagttat	300
ccgctcacgt	tcggtgctgg	gaccaagctg	gagctgaaa			339

15 <210> 62  
 <211> 318  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

<400> 62

caaattgttc	tcaccagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc	60
ataacctgca	gtgccagctc	aagtgttaagt	tacatgcact	ggttccagca	gaagccaggc	120
acttctccca	aactctggat	ttatagcaca	tccaacctgg	cttctggagt	ccctgctcgc	180
ttcagtggca	gtggatctgg	gacctcttac	tctctcaca	tcagccgaat	ggaggctgaa	240
gatgctgcca	cttattactg	ccagcaaagg	agtagttacc	caccacggt	cggagggggg	300
accaagctgg	aaataaaa					318

25 <210> 63  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

ES 2 555 979 T3

```

<400> 63
gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
atcacctgca aggccagtca gaatgttcgt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120
gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg .gcatccaacc ggcacactgg agtcctgat 180
cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 240
gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 300
ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

```

<210> 64  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

10

```

<400> 64
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
atgagctgca agtccagtca gaggcttcta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggetga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
ccgctcacgt tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

```

<210> 65  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

20

```

<400> 65
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact 60
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgcaggetga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
ccattcacgt tcgggtcggg gacaaagttg gaaataaaa 339

```

25

<210> 66  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

30

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

<400> 66

ES 2 555 979 T3

```

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctact    60
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttgget    120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg    180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc    240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg    300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa                                336

```

<210> 67  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

10

```

<400> 67
gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact    60
atgagctgca agtccagtca ggcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc    120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg    180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc    240
atcagcagtg tgcaggctga agacctgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat    300
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa                            339

```

<210> 68  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

20

```

<400> 68
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact    60
atgagctgca agtccagtca ggcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc    120
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg    180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc    240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat    300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa                            339

```

<210> 69  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

25

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: producto de PCR

30

<400> 69

ES 2 555 979 T3

	aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc	60
	ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgttt cctgggatca acagaaacca	120
	gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat	180
	cgcttcacag gcagtggtac tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct	240
	gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcgggtgct	300
	gggaccaagc tggagctgaa a	321
5	<210> 70 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
10	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 70 gagaaagctt gccgccacca tggaatggac ctgggtcttt ctc	43
15	<210> 71 <211> 43 <212> ADN <213> Artificial	
20	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 71 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtc	43
25	<210> 72 <211> 47 <212> ADN <213> Artificial	
30	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
35	<400> 72 gagaaagctt gccgccacca tggattggct gtggaactg ctattcc	47
40	<210> 73 <211> 44 <212> ADN <213> Artificial	
45	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 73 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc	44
50	<210> 74 <211> 46 <212> ADN <213> Artificial	
55	<220> <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 74 gagaaagctt gccgccacca tggaatggat ctggatcttt ctcttc	46

ES 2 555 979 T3

	<210> 75	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 75	
10	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtgc	44
	<210> 76	
	<211> 46	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 76	
20	gagaaagctt gccccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttc	46
	<210> 77	
	<211> 43	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 77	
	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg	43
	<210> 78	
35	<211> 47	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 78	
	gagaaagctt gccccacca tgaatggag gatctttctc ttcaccc	47
45	<210> 79	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 79	
55	gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gtgc	44
	<210> 80	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 80	
65	gagaggcttc aagcttagcc accatggact ggatttgat catgctccat c	51

	<210> 81	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 81	
10	gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtcc	44
	<210> 82	
	<211> 43	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 82	
20	gagaaagctt gccccacca tggatcaca gactcagtc ctc	43
	<210> 83	
	<211> 34	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 83	
	cacacgtacg ttcagctcc agcttggctc cagc	34
	<210> 84	
35	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 84	
	gagaaagctt gccccacca tgcatttca agtcagatt ttcagc	46
45	<210> 85	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 85	
55	cacacgtacg tttatttcc agcttggctc	30
	<210> 86	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 86	
65	gagaaagctt gccccacca tggagtttca gaccaggtc tttg	44

	<210> 87	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 87	
10	cacacgtacg tttgattcc agcttggtgc ctc	33
	<210> 88	
	<211> 46	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 88	
20	gagaaagctt gccccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatg	46
	<210> 89	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 89	
	cacacgtacg ttcagctcc agcttggtcc	30
	<210> 90	
35	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 90	
	gagaaagctt gccccacca tggaaacaca gactcaggtc cttatg	46
45	<210> 91	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 91	
55	cacacgtacg ttttattcc aactttgtcc	30
	<210> 92	
	<211> 49	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 92	
65	gagaaagctt gccccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatattg	49

	<210> 93	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
5	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 93	
10	cacacgtacg tttatttcc agcttgggcc	30
	<210> 94	
	<211> 46	
	<212> ADN	
15	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 94	
20	gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt cttatg	46
	<210> 95	
	<211> 30	
25	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
30	<400> 95	
	cacacgtacg tttatttcc agcttgggcc	30
	<210> 96	
35	<211> 46	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 96	
	gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggctcaggtt cttatg	46
45	<210> 97	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
50	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 97	
55	cacacgtacg ttcagctcc agcttgggcc cag	33
	<210> 98	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
60	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido	
	<400> 98	
65	gagaaagctt agccacatg gaatcacaga ctctgttctt c	41

ES 2 555 979 T3

<210> 99  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

10 <400> 99  
 cacacgtacg ttcagctcc agcttggctc 30

<210> 100  
 <211> 1401  
 <212> ADN  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal

20 <400> 100

atggaatgga cctgggtctt tctcttcttc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactcccag	60
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc	120
tgcaaggcta ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct	180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctgga gtggtagtac taactacaat	240
gagaagtcca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg	300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atatgattac	360
cctctggttg cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc ctcccaccaag	420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	480
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	540
gccctgacca gggcgctgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
ctcagcagcg tgggtaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggts gacaagaag ttgagcccaa atcttgtgac	720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagctcttc	780
cttttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	840
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggtctcca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg	1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1140
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaagcc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac	1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac	1320
gttttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc	1380
tcctgtctc cgggtaaatg a	1401

<210> 101  
 <211> 1404  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

ES 2 555 979 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal

<400> 101

atggattggc	tgtggaactt	gctattcctg	atggcagctg	cccaaagtat	ccaagcacag	60	
atccagttgg	tgcagtctgg	acctgagctg	aagaagcctg	gagagacagt	caagatctcc	120	
tgcaaggctt	ctgggtatac	cttcacaaac	tatggaatga	actgggtgaa	gcaggctcca	180	
ggaaagggtt	taaagtggat	gggctggata	aacaccaaca	ctggagagcc	aacatatgct	240	
gaagagtcca	agggacggtt	tgctttctct	ttggaaacct	ctgccagcac	tgctattttg	300	
cagatcaaca	acctcaaaaa	tgaggacacg	gctacatatt	tctgtgcaag	actgggtttt	360	
ggtaatgcta	tggactactg	gggtcaagga	acctcagtca	ccgtctcttc	agcctccacc	420	
aagggcccat	cggctctccc	cctggcacc	tcctccaaga	gcacctctgg	gggcacagcg	480	
gccctgggct	gcctggtcaa	ggactacttc	cccgaaccgg	tgacgggtgc	gtggaactca	540	
ggcgccctga	ccageggcgt	gcacaccttc	ccggctgtcc	tacagtcttc	aggactctac	600	
tcctctagca	gcgtggtgac	cgtgcccctc	agcagcttgg	gcaccagac	ctacatctgc	660	
aacgtgaatc	acaagcccag	caacaccaag	gtggacaaga	aagttgagcc	caaatcttgt	720	
gacaaaactc	acacatgccc	accgtgcccc	gcacctgaac	tcctgggggg	accgtcagtc	780	
ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcaca	840	
tgcggtggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	900	
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	960	
cgtgtggtca	gegtccctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaa	1020	
tgcaaggctc	ccaacaaagc	cctcccagcc	cccatcgaga	aaacctctc	caaagccaaa	1080	
gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccgggatga	gctgaccaag	1140	
aaccagggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctatc	ccagcgacat	cgccgtggag	1200	
5	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgctcccgt	gctggactcc	1260
	gacggctcct	tcttctctca	tagcaagctc	accgtggaca	agagcaggtg	gcagcagggg	1320
	aacgtcttct	catgctccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	gcagaagagc	1380
	ctctccctgt	ctccgggtaa	atga			1404	

<210> 102

<211> 1398

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal

15

<400> 102

ES 2 555 979 T3

```

atggaatgga tctggatcct tctcttcac cctcaggaa ctgcaggtgt ccaactcccag 60
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg gcgaggcccc gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggcct ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa gcagaggact 180
ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt tatcctggaa gtggtaatac ttactacaat 240
gagaagtcca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag atcgtatggg 360
gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagcctc caccaagggc 420
ccatcggctct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg 480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtccctacagt cctcaggact ctactccctc 600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgg agcccaaatc ttgtgacaaa 720
actcacacat gcccacgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttctc 780
ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccgga ccctgaggt cacatgctg 840
gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaagc aaagcccgcg gagggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1020
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatccccgg atgagctgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatga 1398

```

<210> 103  
 <211> 1404  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 103

ES 2 555 979 T3

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct 180
ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tatecttctg atagttatac taactacaat 240
caaaaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
cagctcagca gcccgacatc tgaggactct gcggctctatt actgtacaag atcgtggagg 360
ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctctc agcctccacc 420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctctcaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
gccctgggct gcctggctca ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
gggcccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttg gacccagac ctacatctgc 660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct ccgggacccc tgaggtcaca 840
tgctgggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggcca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgggggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
cgtgtggcca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
aaccaggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 1260
gacggctctc tcttctctca tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

```

<210> 104  
 <211> 1401  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 104

ES 2 555 979 T3

atggaatgga ggatctttct cttcatcctg tcaggaactg caggtgtcca ctcccaggtt 60  
 cagctgcagc agtctggacc tgagctggg aagcctgggg cttcagtgaa gatgtcctgc 120  
 aaggcttctg gatacacatt cactgactat gttataagct gggggaagca gagaactgga 180  
 cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagtg gtagtactta ctacaatgag 240  
 aagttcaagg gcaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag 300  
 ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagagg ggtattacta 360  
 cgggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 420  
 ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480  
 ctgggctgcc tgggcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcagge 540  
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600  
 ctcagcagcg tgggtaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660  
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720  
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780  
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840  
 gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900  
 gtggagggtg ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960  
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020  
 aagggtccca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080  
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg cccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140  
 caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200  
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260  
 ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320  
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380  
 tccctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 105  
 <211> 1410  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 105

atggactgga tttgatcat gctccatctg ctggcagcag ctacaggtat ccaatcccag 60

ES 2 555 979 T3

gttcacctac aacagtctgg ttctgaactg aggagtcctg ggtcttcagt aaagctttca 120  
 tgcaaggatt ttgattcaga agtcttcctt tttgcttata tgagttggat taggcagaag 180  
 cctgggcatg gatttgaatg gattggagac atactcccaa gtattggtag aacaatctat 240  
 ggagagaagt ttgaggacaa agccacactg gatgcagaca cagtgtccaa cacagcctac 300  
 ttggagctca acagtctgac atctgaggac tctgctatct actactgtgc aaggggggag 360  
 ggctacggtg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcagcc 420  
 tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480  
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540  
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600  
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660  
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagccaaa 720  
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780  
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaacccaag gacaccctca tgatctcccg gaccctcag 840  
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900  
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960  
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacccgc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020  
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080  
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140  
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200  
 gtggagtggtg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260  
 gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320  
 caggggaaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgacacaacca ctacacgacg 1380  
 aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 1410

<210> 106  
 <211> 723  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 106  
 atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg tacctgtggg 60  
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 120  
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtgga atcaaaagaa ctacttgacc 180  
 tggtaaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240

ES 2 555 979 T3

gaatctgggg	tccctgatcg	cttcacaggc	agtggatctg	gaacagattt	cactctcacc	300
atcagcagtg	tgcaggctga	agacctggca	gtttattact	gtcagaatga	ttatagttat	360
ccgctcacgt	tgggtgctgg	gaccaagctg	gagctgaaac	gtacgggtggc	tgcaccatct	420
gtcttcatct	tcccgccatc	tgatgagcag	ttgaaatctg	gaactgcctc	tgttggtgtc	480
ctgctgaata	acttctatcc	cagagaggcc	aaagtacagt	ggaagggtgga	taacgcctc	540
caatcgggta	actcccagga	gagtgtcaca	gagcaggaca	gcaaggacag	cacctacagc	600
ctcagcagca	ccctgacgct	gagcaaagca	gactacgaga	aacacaaagt	ctacgcctgc	660
gaagtcaccc	atcagggcct	gagctcgccc	gtcacaaga	gcttcaacag	gggagagtgt	720
tag						723

5 <210> 107  
 <211> 708  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 107	atgcattttc	aagtgcagat	tttcagcttc	ctgctaataca	gtgcctcagt	cataatgtcc	60
	agaggacaaa	ttgttctcac	ccagctctcca	gcaatcatgt	ctgcatctcc	aggggagaag	120
	gtcaccataa	cctgcagtgc	cagctcaagt	gtaagttaca	tgcactgggt	ccagcagaag	180
	ccaggcactt	ctcccaaact	ctggatttat	agcacatcca	acctggcttc	tggagtcctc	240
	gctcgcttca	gtggcagtgg	atctgggacc	tcttactctc	tcacaatcag	ccgaatggag	300
	gctgaagatg	ctgccactta	ttactgccag	caaaggagta	gttaccacc	cacgttcgga	360
	ggggggacca	agctggaaat	aaaacgtacg	gtggctgcac	catctgtctt	catcttcccg	420
	ccatctgatg	agcagttgaa	atctggaact	gcctctgttg	tgtgcctgct	gaataacttc	480
	tatcccagag	aggccaaagt	acagtggaag	gtggataacg	ccctccaatc	gggtaactcc	540
	caggagagtg	tcacagagca	ggacagcaag	gacagcacct	acagcctcag	cagcaccctg	600
	acgctgagca	aagcagacta	cgagaaacac	aaagtctacg	cctgcgaagt	caccatcag	660
	ggcctgagct	cgcccgtcac	aaagagcttc	aacaggggag	agtgttag		708

15 <210> 108  
 <211> 705  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 108	atggagtttc	agaccaggt	ctttgtattc	gtgttgctct	ggttgctctg	tgttgatgga	60
-----------	------------	-----------	------------	------------	------------	------------	----

ES 2 555 979 T3

```

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaatc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtc gaatgttcgt actgctgtag cctggatca acagaaacca 180
gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtcctgat 240
cgcttcacag gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 300
gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgc tctgttgtgt gctctgtaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggt gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

```

<210> 109  
 <211> 723  
 5 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 10 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

```

<400> 109
atggattcac aggccagggt tcttatgtta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc cttagctgtgt cagttggaga gaaggttact 120
atgagctgca agtccagtc gagccttcta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga ttacttgggc atccactagg 240
gaaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgcgc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

<210> 110  
 15 <211> 723  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

<220>  
 20 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 110

ES 2 555 979 T3

```

atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctcact 120
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 360
ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgt gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgcct gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtg 720
tag 723

```

5 <210> 111  
 <211> 720  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

```

<400> 111
atggattcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctcact 120
atgagctgca aatccagtca gagtctgtct aacagttaga cccgaaagaa ctacttggtct 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagctcctt aaactgttga tctactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg 360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggtctgc accatctgtc 420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 480
ctgaataact tctatcccag agaggcctaa gtacagtgga aggtggataa cgcctccaa 540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc 600
agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa 660
gtcacccatc agggcctgag ctgcctcctc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag 720

```

15 <210> 112  
 <211> 723  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 112

ES 2 555 979 T3

```

atggattcac aggccaggt tcttatgta ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 120
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tggtagcagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga ttacttgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 360
ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

5 <210> 113  
 <211> 723  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

```

<400> 113
atggattcac aggctcaggt tcttatgta ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 120
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tggtagcagc agaaaccagg gcagtcctct aaactgctga ttacttgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360
ccgtcacgct tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

15 <210> 114  
 <211> 705  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 114

ES 2 555 979 T3

```

atggaatcac agactctggg cttcatatcc atactgctct ggttatatgg agctgatggg      60
aacattgtaa tgacceaatc tccc aaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc     120
ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgttt cctgggatca acagaaacca     180
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat     240
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct     300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcggtgct     360
gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgccca     420
tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat     480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag     540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg     600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc     660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                       705

```

<210> 115  
 <211> 466  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 115

```

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

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

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

```

ES 2 555 979 T3

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

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

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn  
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys

5 <210> 116  
 <211> 467  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico  
 <400> 116

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

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

ES 2 555 979 T3

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

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 465

5 <210> 117  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 117

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg  
 20 25 30

ES 2 555 979 T3

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

Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu  
           50                                  55                                  60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

---

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys  
 465

- <210> 118
- <211> 467
- 5 <212> PRT
- <213> Artificial

- <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

- 10 <400> 118

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

ES 2 555 979 T3

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

---

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys  
 465

<210> 119  
 <211> 466  
 <212> PRT  
 5 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 119

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

ES 2 555 979 T3

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

---

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys  
 465

5 <210> 120  
 <211> 469  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico  
 <400> 120

ES 2 555 979 T3

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly  
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser  
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val  
 35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly  
 50 55 60

Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr  
 65 70 75 80

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

Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala  
 100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr  
 115 120 125

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

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

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

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

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val  
 195 200 205

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

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

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

ES 2 555 979 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys  
 465

5 <210> 121  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 121

ES 2 555 979 T3

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 Ile 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 Gln 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 Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

<210> 122  
 <211> 235  
 5 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 122

ES 2 555 979 T3

Met His Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser  
 1 5 10 15

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

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

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

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro  
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 123  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 123

ES 2 555 979 T3

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

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser  
 20 25 30

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

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

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 124  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 124

ES 2 555 979 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser 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 Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

5 <210> 125  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 125

ES 2 555 979 T3

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 Ile 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 Gln 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 Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr  
 115 120 125

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

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys  
 145 150 155 160  
 Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val  
 165 170 175

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

5 <210> 126  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 126

ES 2 555 979 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 127  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 127

ES 2 555 979 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser 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 Ala Thr Asp  
 85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr  
 100 105 110  
 His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

5 <210> 128  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 128

ES 2 555 979 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser  
 1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln  
 50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser 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 Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr  
 100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr  
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 225 230 235 240

5 <210> 129  
 <211> 234  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 129

ES 2 555 979 T3

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

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

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn  
 35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro  
 50 55 60  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp  
 65 70 75 80

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

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr  
 100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

5 <210> 130  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 130  
 ccaagggcta tggcggtc

18

15 <210> 131  
 <211> 18  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

20 <220>

ES 2 555 979 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: oligonucleótido

<400> 131  
ccgaagggtg acctggtc

18

5

<210> 132  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 132

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

15

<210> 133  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> Artificial

20

<220>  
<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 133

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

25

ES 2 555 979 T3

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met  
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe  
 50 55 60

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 134  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR  
 <400> 134

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser  
 115

15 <210> 135  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR  
 <400> 135

ES 2 555 979 T3

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

<210> 136  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

10

<400> 136

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

15 <210> 137  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

ES 2 555 979 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 137

5

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

<210> 138

<211> 113

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

15

<400> 138

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

ES 2 555 979 T3

<210> 139  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 139

```

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
                20                25                30

His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
          35          40          45
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50                55                60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65                70                75                80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
                85                90                95

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

10

<210> 140  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

20

<400> 140

```

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

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

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

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

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

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
                85                90                95

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

25

<210> 141  
 <211> 113  
 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

5

<400> 141

```

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20          25          30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85          90          95

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

Lys
    
```

<210> 142

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 142

```

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20          25          30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65          70          75          80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85          90          95

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

Lys
    
```

20

ES 2 555 979 T3

<210> 143  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 143

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

10

<210> 144  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

20 <400> 144

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

Lys

ES 2 555 979 T3

<210> 145  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

<400> 145

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

10

<210> 146  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: traducción de producto de PCR

20 <400> 146

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

<210> 147

ES 2 555 979 T3

<211> 324  
 <212> ADN  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: ácido nucleico con codones optimizados

<400> 147  
 cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc 60  
 ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag 120  
 tgggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac 180  
 agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgacct tgagcaaggc cgactacgag 240  
 aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag 300  
 agcttcaaca ggggcgagtg ctag 324

10 <210> 148  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

15 <220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: proteína optimizada con codón

<400> 148  
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe  
 20 25 30  
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln  
 35 40 45  
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser  
 50 55 60  
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu  
 65 70 75 80  
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser  
 85 90 95  
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 100 105

20 <210> 149  
 <211> 981  
 <212> ADN  
 25 <213> Artificial

<220>  
 <223> Descripción de secuencia artificial: ácido nucleico optimizado con codón

30 <400> 149

ES 2 555 979 T3

```

ggcccaagcg tgttccccct ggccccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc      60
ctgggctgcc tggatgaagga ctacttcccc gagccccgtga ccgtgagctg gaaacagcgg      120
gccctgacct cggcgctgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc      180
ctgagcagcg tggatgacct gccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac      240
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac      300
aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcgacc cagcgtgttc      360
ctgttcccc ccaagcccaa ggacacctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggtg cgtggacggc      480
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg      540
gtggtgtccg tgctgacctg gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc      600
aaggctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc      660
cagccacggg agccccaggt gtacacctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac      720
cagggtgccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatgc cgtggagtgg      780
gagagcaacg gccagccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgac      840
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac      900
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtcctg      960
agcctgagcc ccggcaagta g      981

```

- 5 <210> 150
- <211> 326
- <212> PRT
- <213> Artificial

- 10 <220>
- <223> Descripción de secuencia artificial: proteína optimizada con codón

<400> 150

```

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 1          5          10          15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 20          25          30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 35          40          45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 50          55          60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 65          70          75

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
 85          90          95

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
100          105          110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115          120          125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130          135          140

```

ES 2 555 979 T3

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn  
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys  
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
325

**REIVINDICACIONES**

1. Anticuerpo que comprende una combinación de cadenas pesadas y cadenas ligeras seleccionada de entre las posibilidades (i) a (ix) siguientes:
- 5 (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 115 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 122,
  - 10 (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 116 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 121,
  - (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 117 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 123,
  - 15 (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 119 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 126,
  - (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 118 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 125,
  - 20 (vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 124,
  - 25 (vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 127,
  - (viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 128, y
  - 30 (ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 120 y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEC ID nº 129.
2. Anticuerpo según la reivindicación 1, que se une a CLD18A1 y a CLD18A2 o se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1.
- 35 3. Anticuerpo según la reivindicación 2, en el que CLD18A2 presenta la secuencia de aminoácidos según la SEC ID nº 2.
- 40 4. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 3, en el que CLD18A1 presenta la secuencia de aminoácidos según la SEC ID nº 8.
5. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se une a los epítomos naturales de CLD18A2 presentes sobre la superficie de células vivas.
- 45 6. Hibridoma que puede producir el anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Conjugado que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 acoplado a un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es preferentemente una toxina, un isótopo radioactivo, un fármaco o un agente citotóxico.
- 50 8. Composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y/o conjugado según la reivindicación 7, y portador farmacéuticamente aceptable.
- 55 9. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 y/o conjugado según la reivindicación 7 para la utilización en un procedimiento de inhibición del crecimiento y/o destrucción de una célula que expresa CLD18A2.
- 60 10. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, conjugado según la reivindicación 7 o composición farmacéutica según la reivindicación 8 para la utilización en un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno que implica a las células que expresan CLD18A2.
- 65 11. Anticuerpo, conjugado o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 10 en el/la que la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores, en el/la que la enfermedad relacionada con tumores es seleccionada preferentemente de entre el grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar, y su metástasis.

12. Anticuerpo, conjugado o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 10 u 11, en el/la que el procedimiento comprende además tratar con un agente quimioterápico, radiación, o una citocina.

5 13. Anticuerpo, conjugado o composición farmacéutica para la utilización según la reivindicación 12, en el/la que el agente quimioterápico es seleccionado de entre el grupo que consiste en doxorubicina, cisplatino, taxotero, 5-fluoroacilo, metotrexato, gencitabina y ciclosfamida.

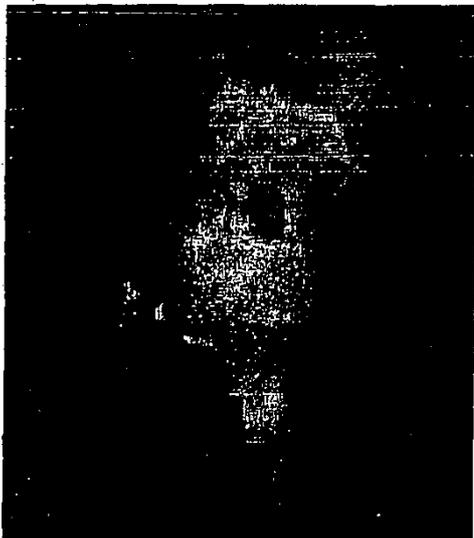
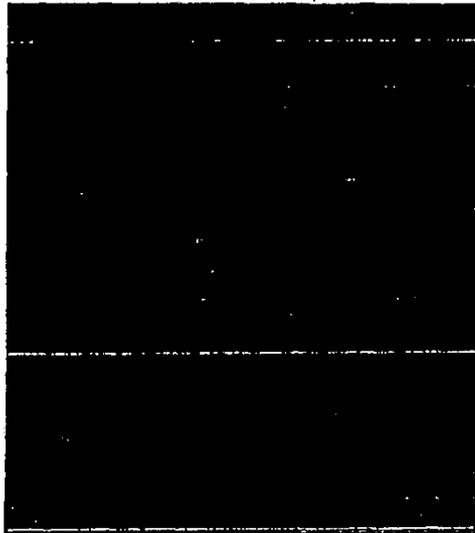
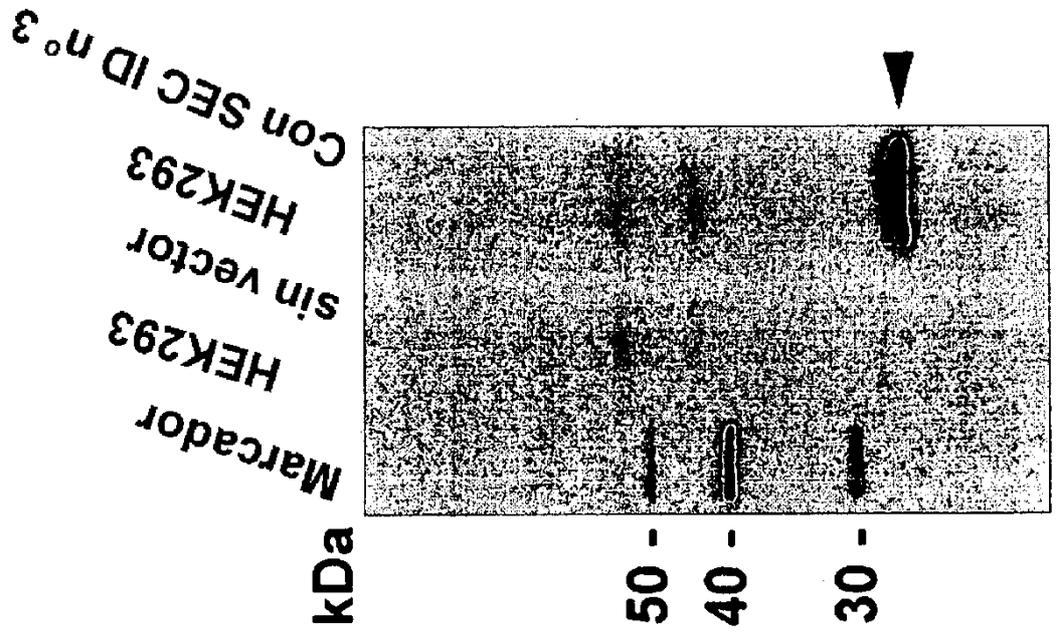
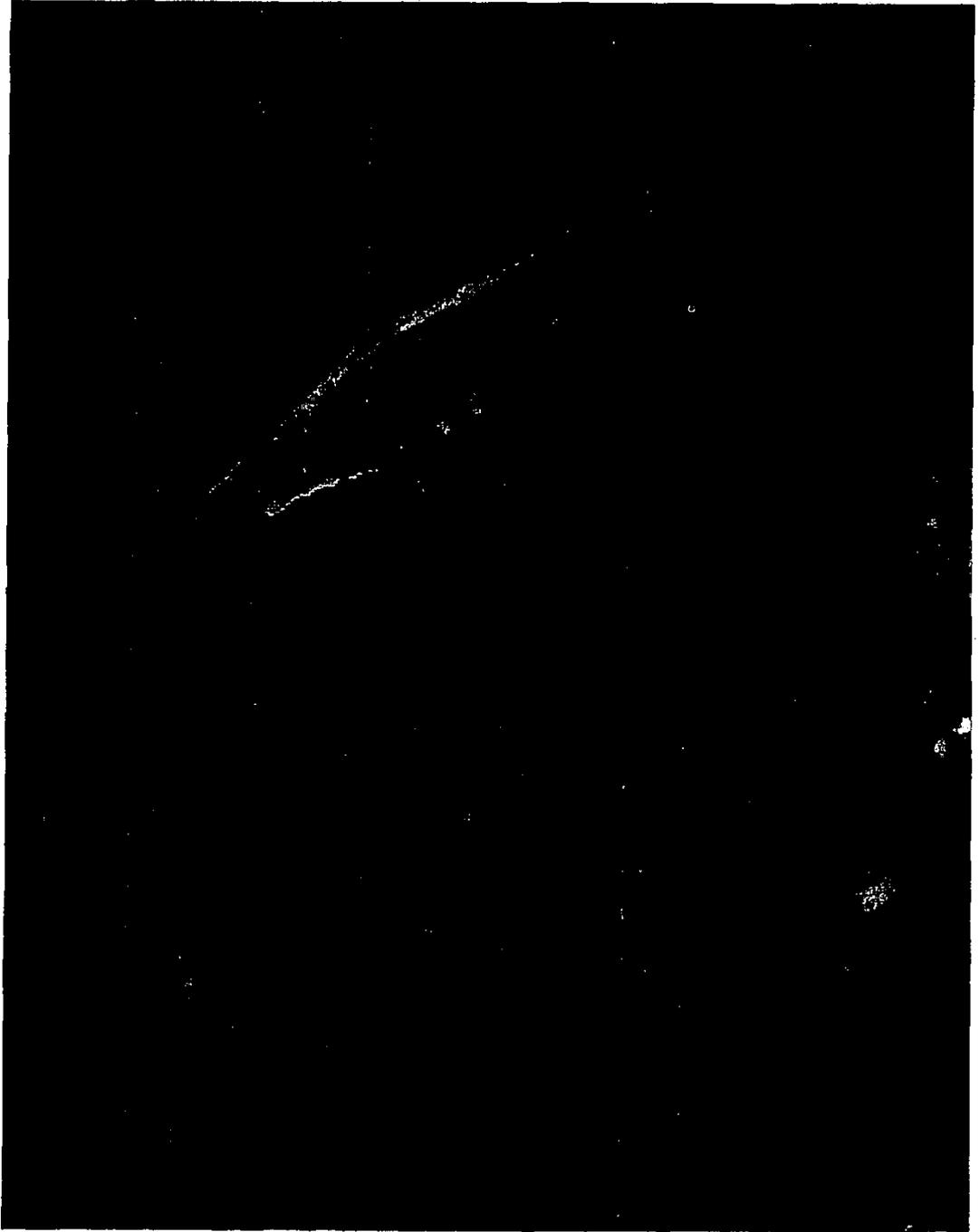


Fig. 1

Fig. 2



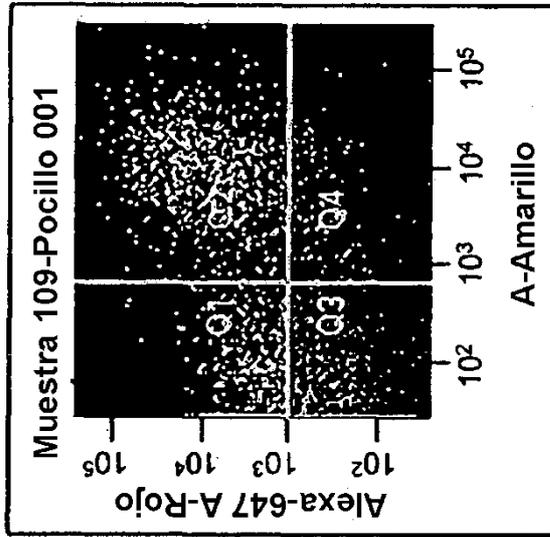


**Fig. 3**

**Fig. 4**

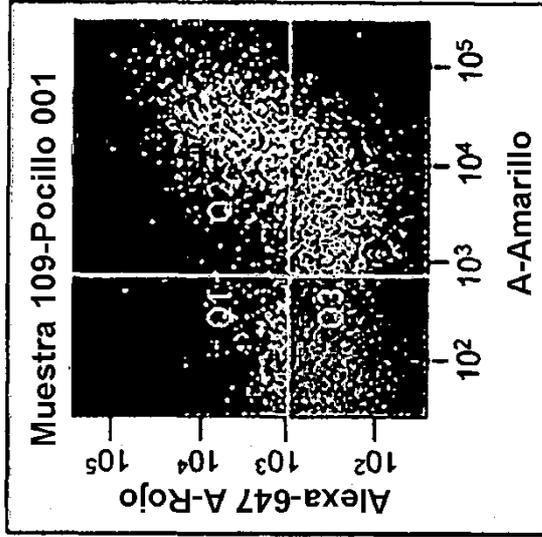
**(A)**

**24H5 (182-D758-034)**



**(B)**

**85A3 (182-D756-002)**



**Fig. 4C**

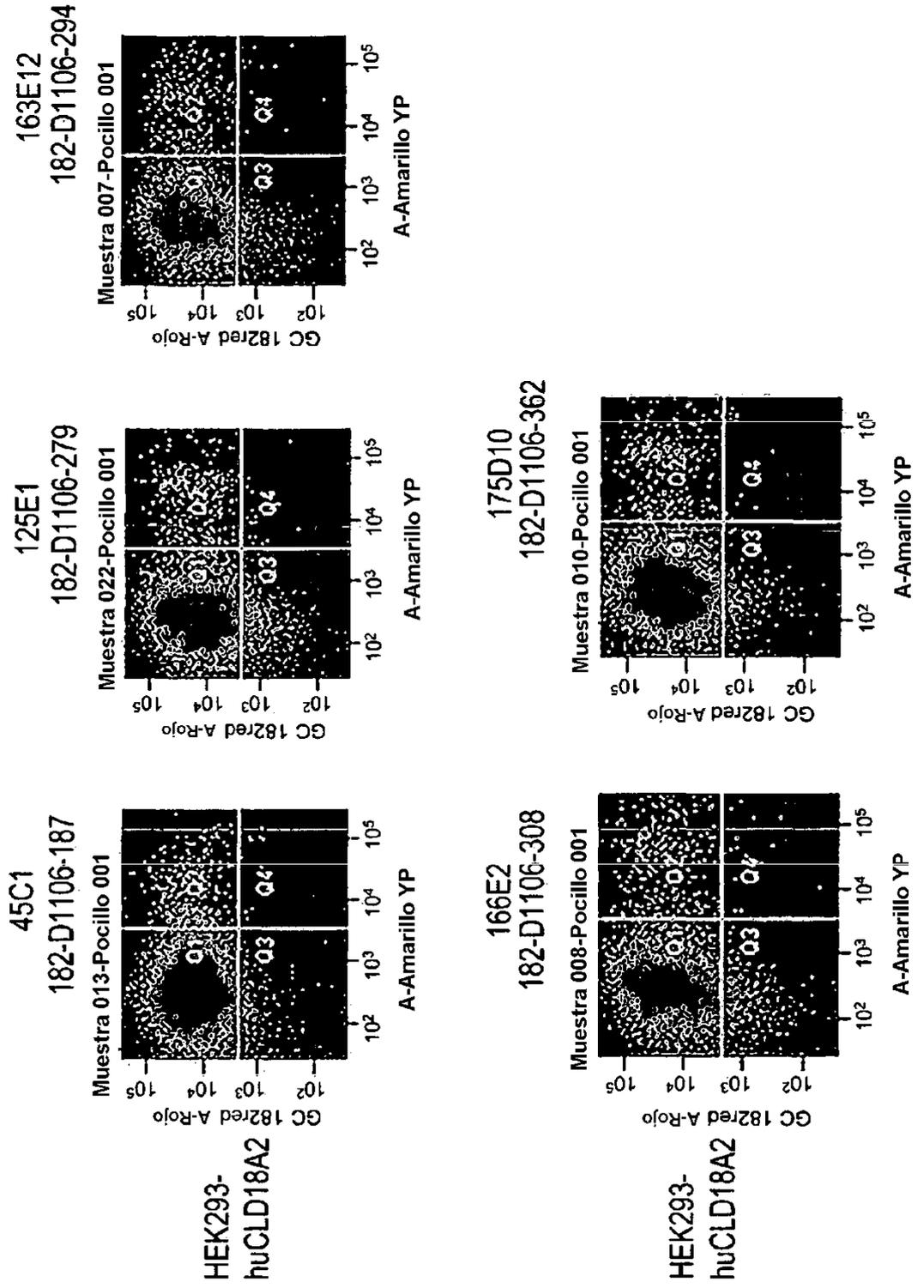


Fig. 5

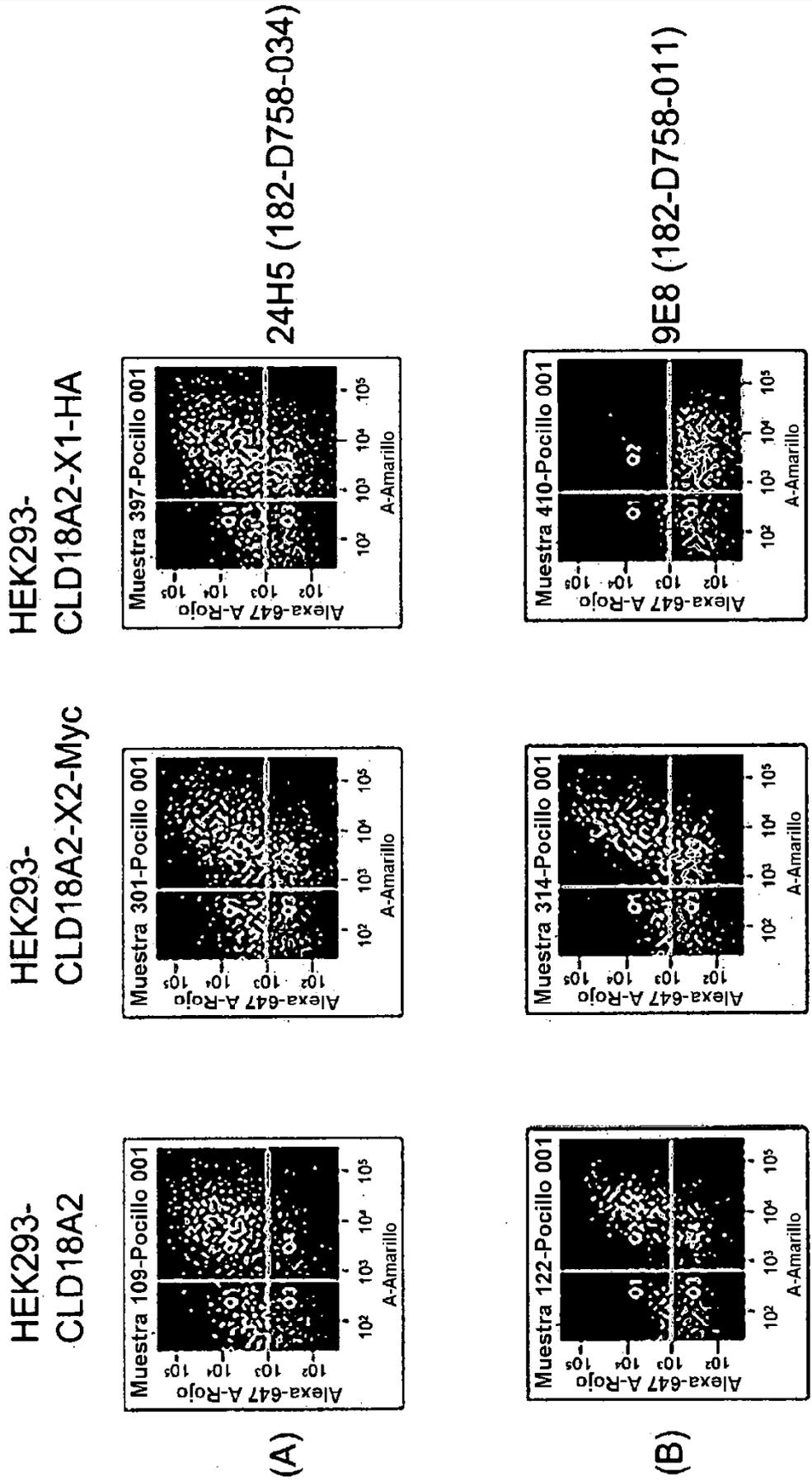


Fig. 5

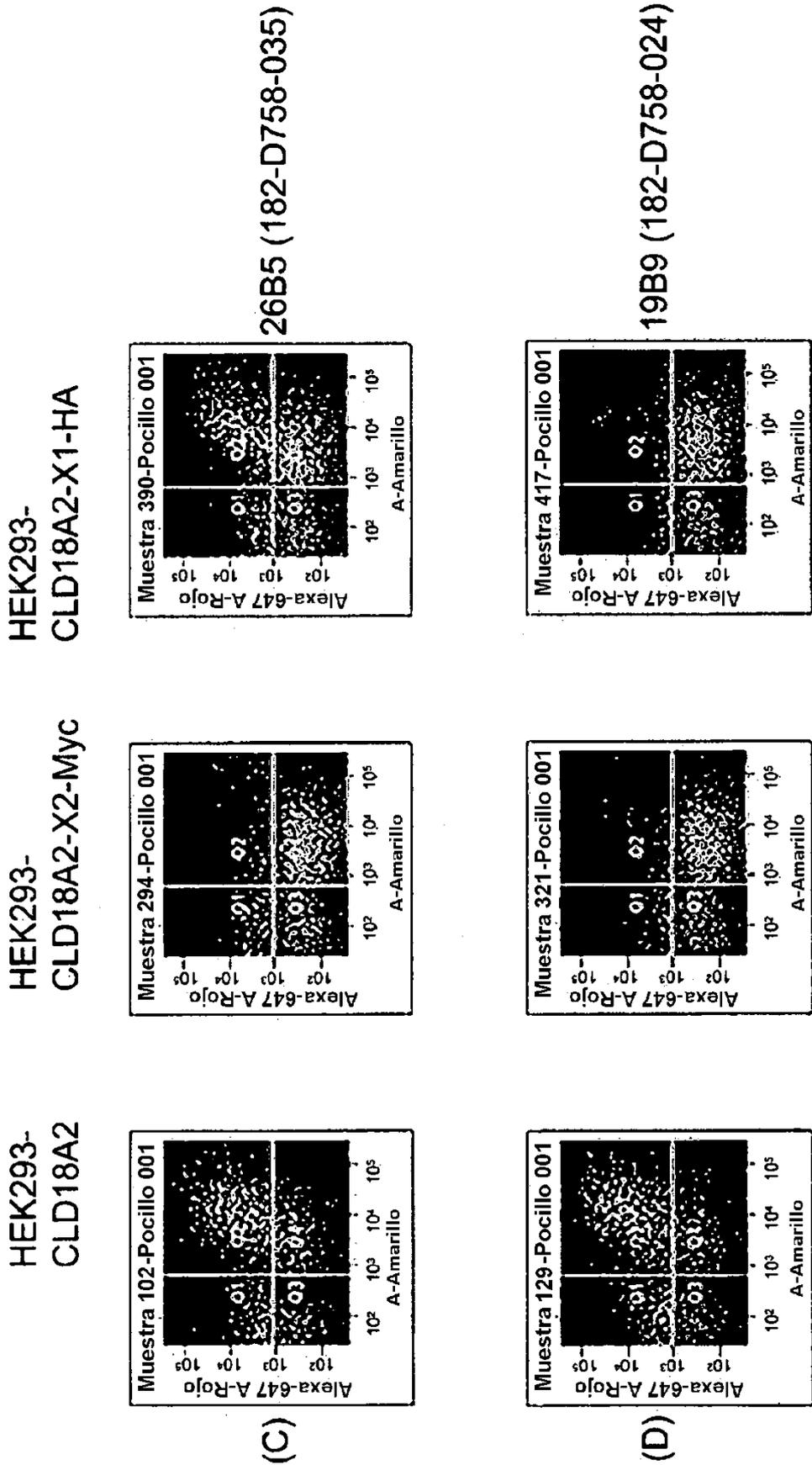
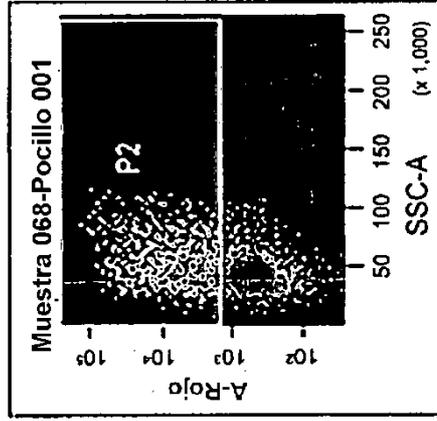


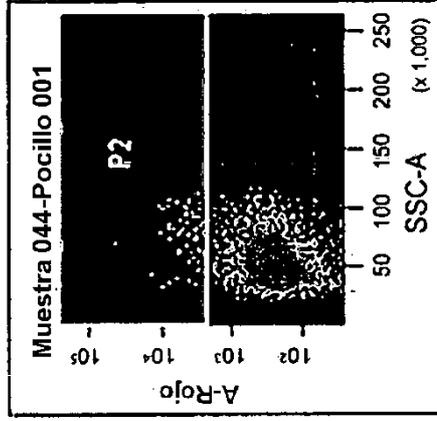
Fig. 6A

HEK293-  
CLD18A2

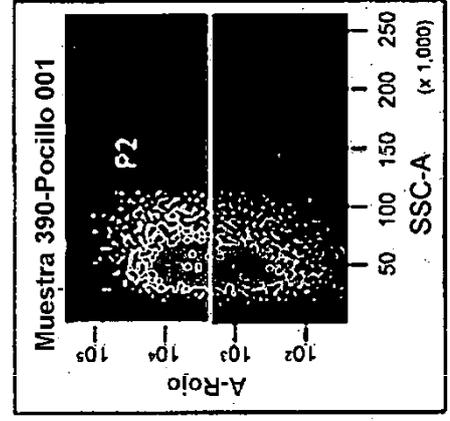
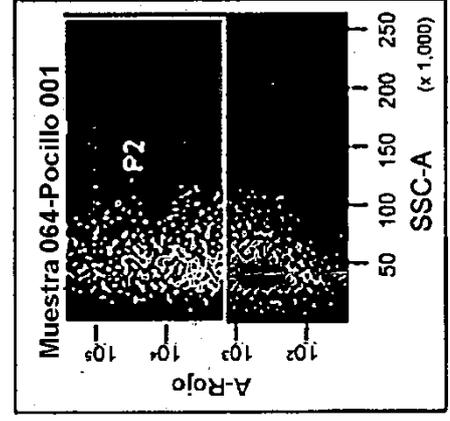


43A11  
182-D1106-062

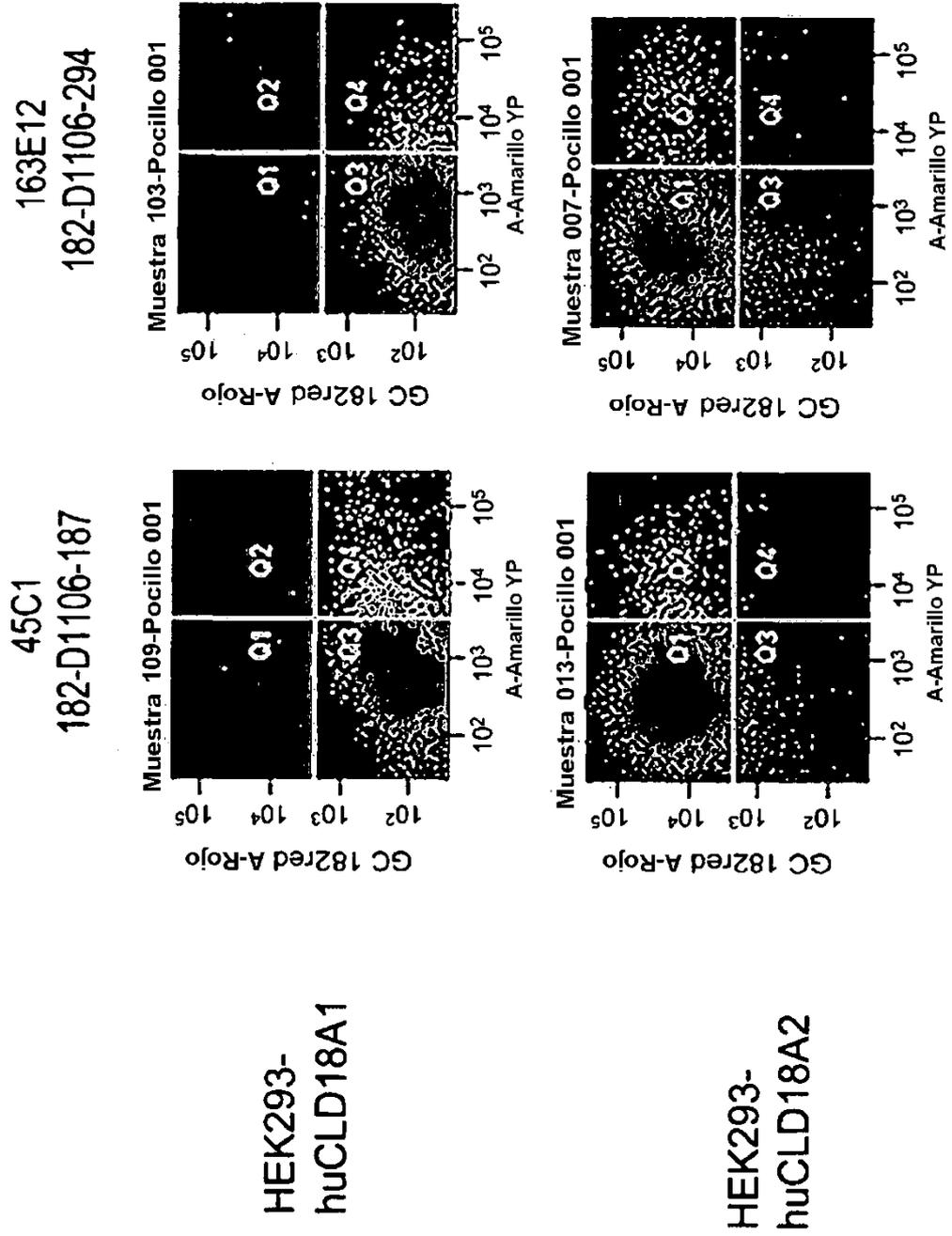
HEK293-  
CLD18A1



37H8  
182-D1106-056



**Fig. 6B**



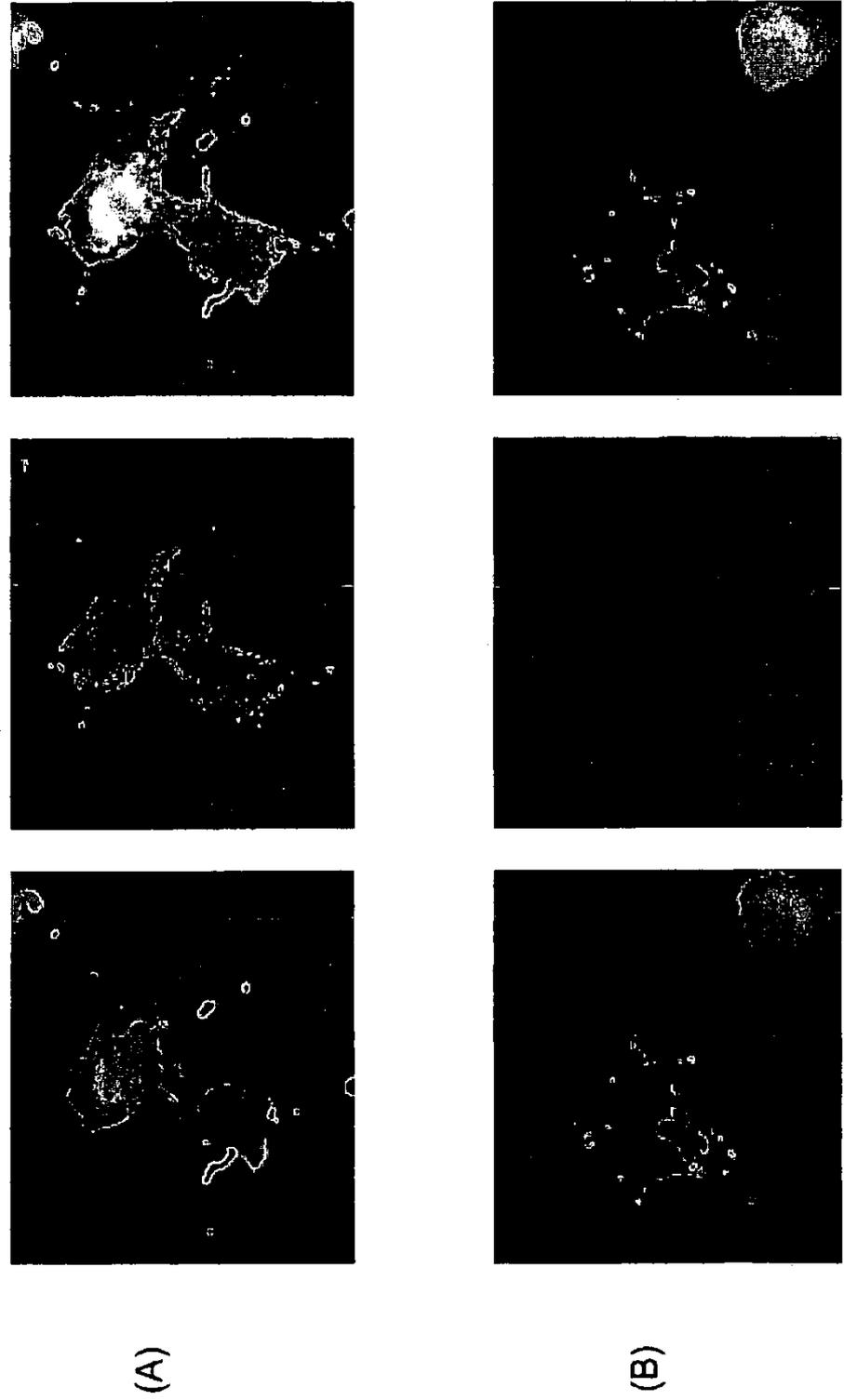


Fig. 7

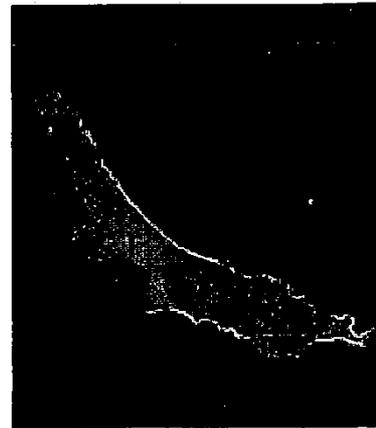
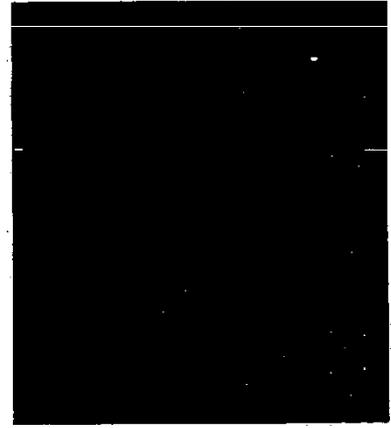
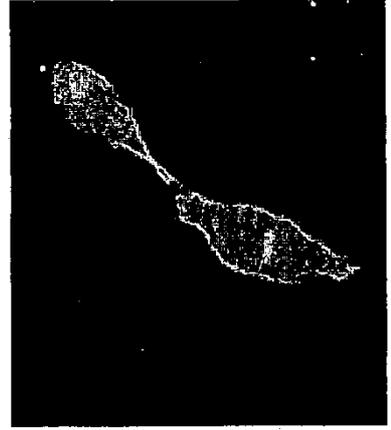
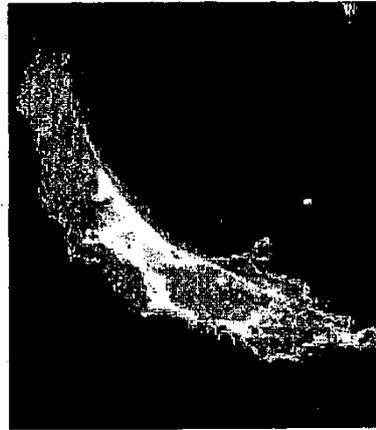


Fig. 7

(C)

(D)

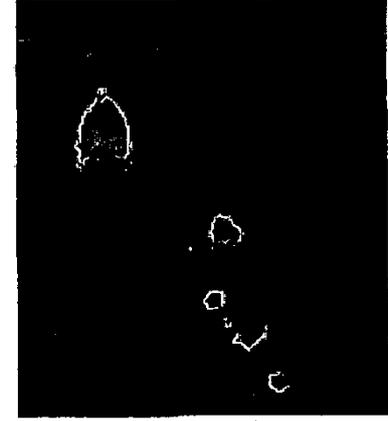
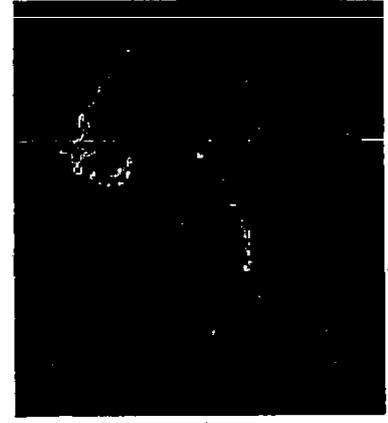
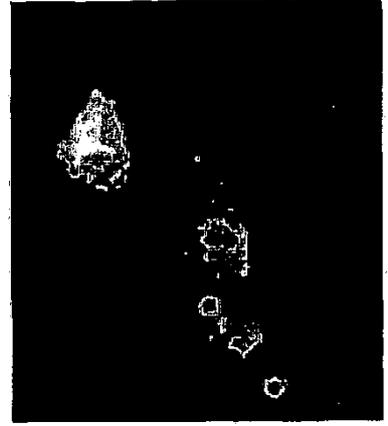
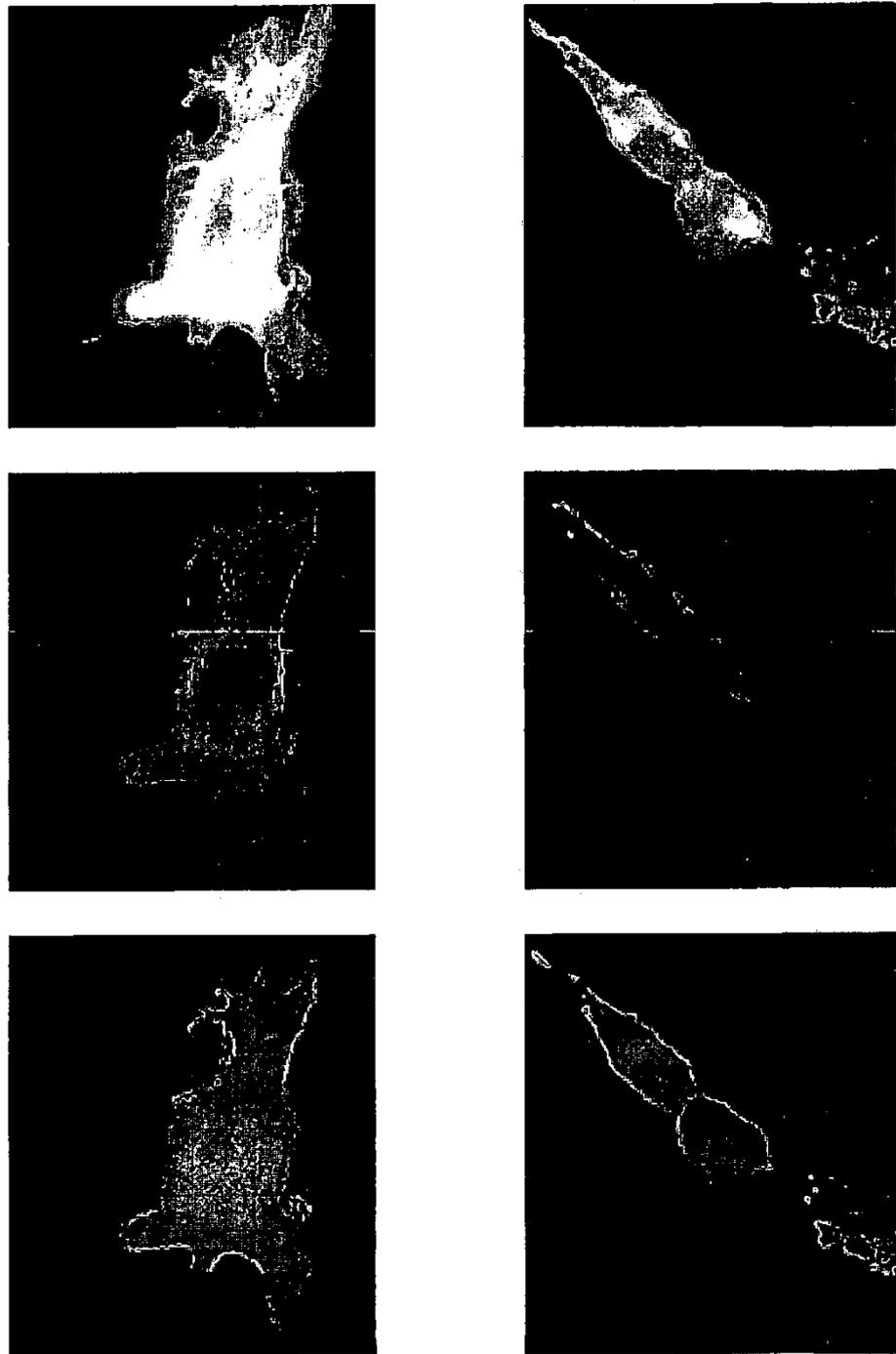


Fig. 8

(A)

(B)



(C)

(D)

Fig. 8

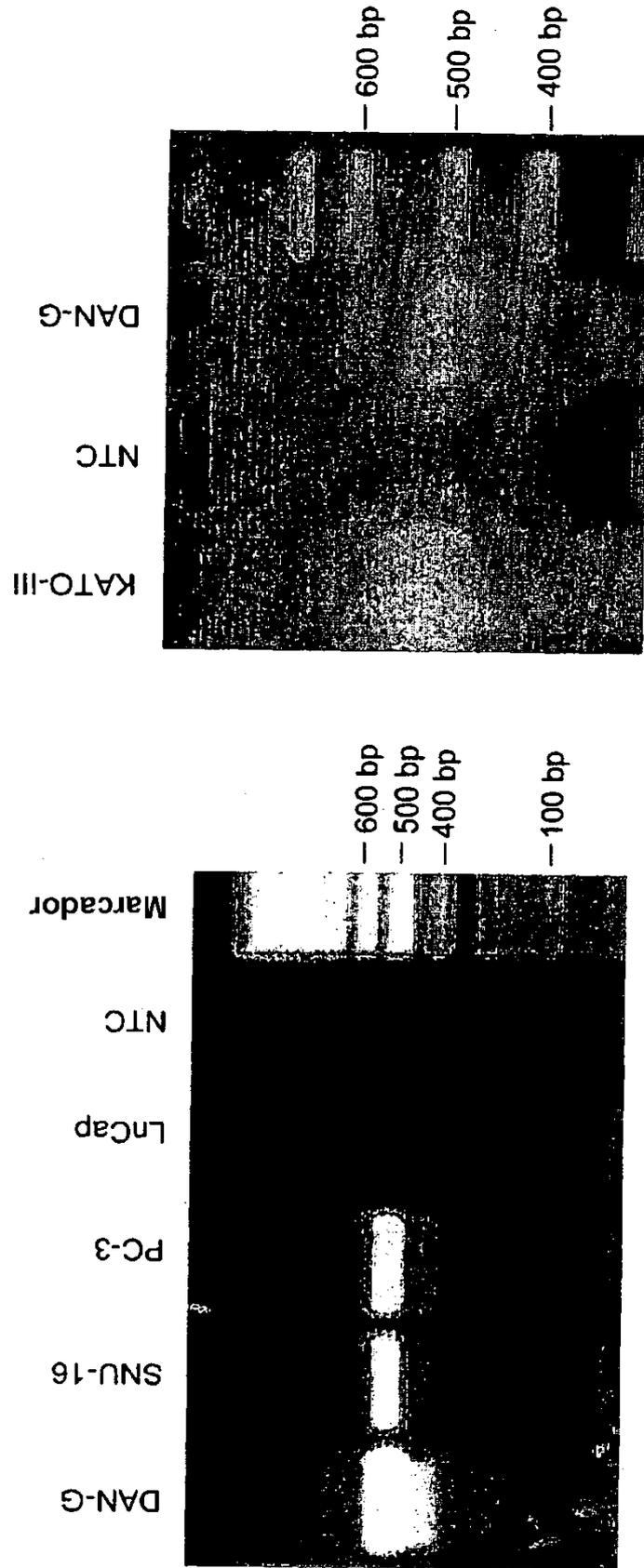
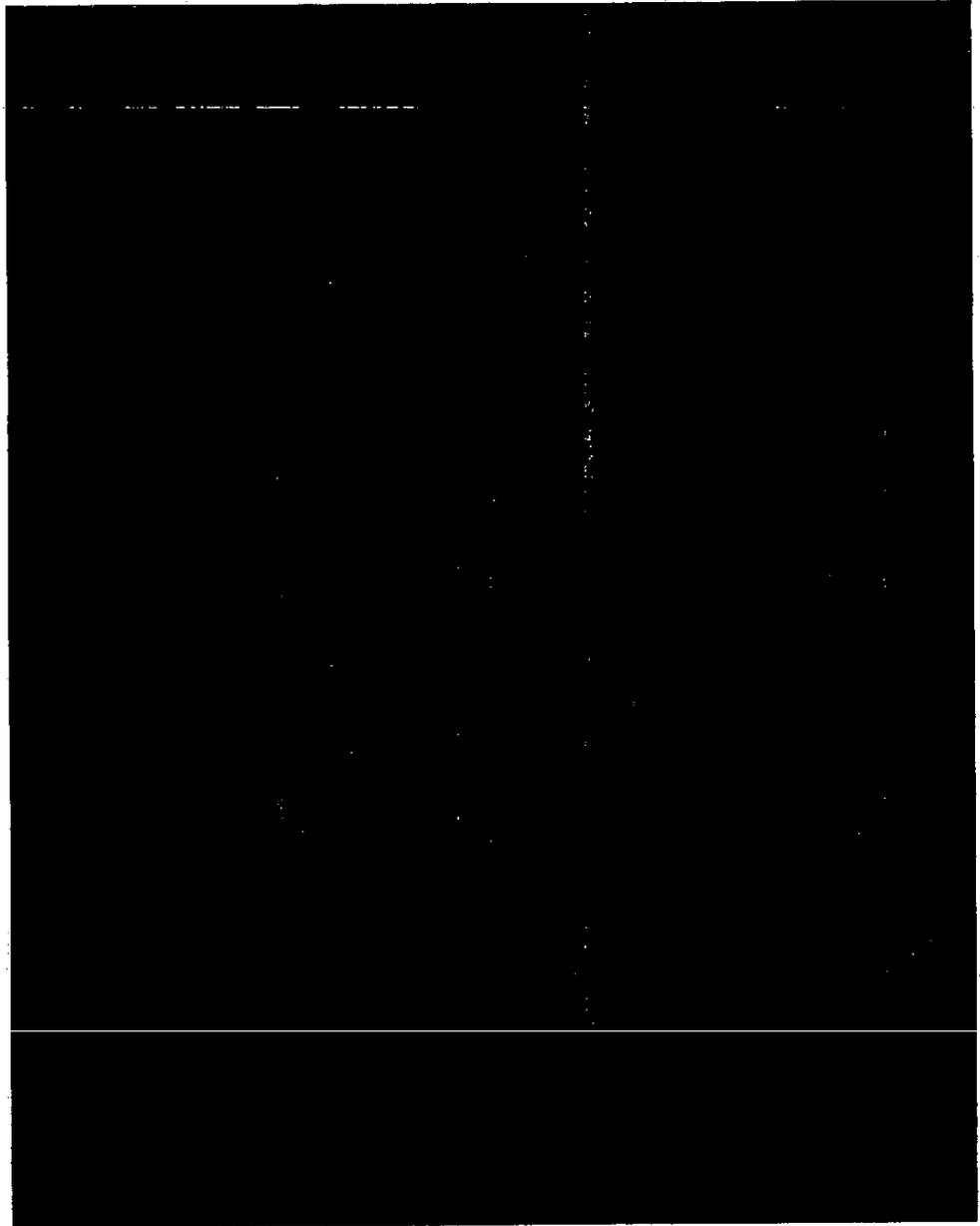
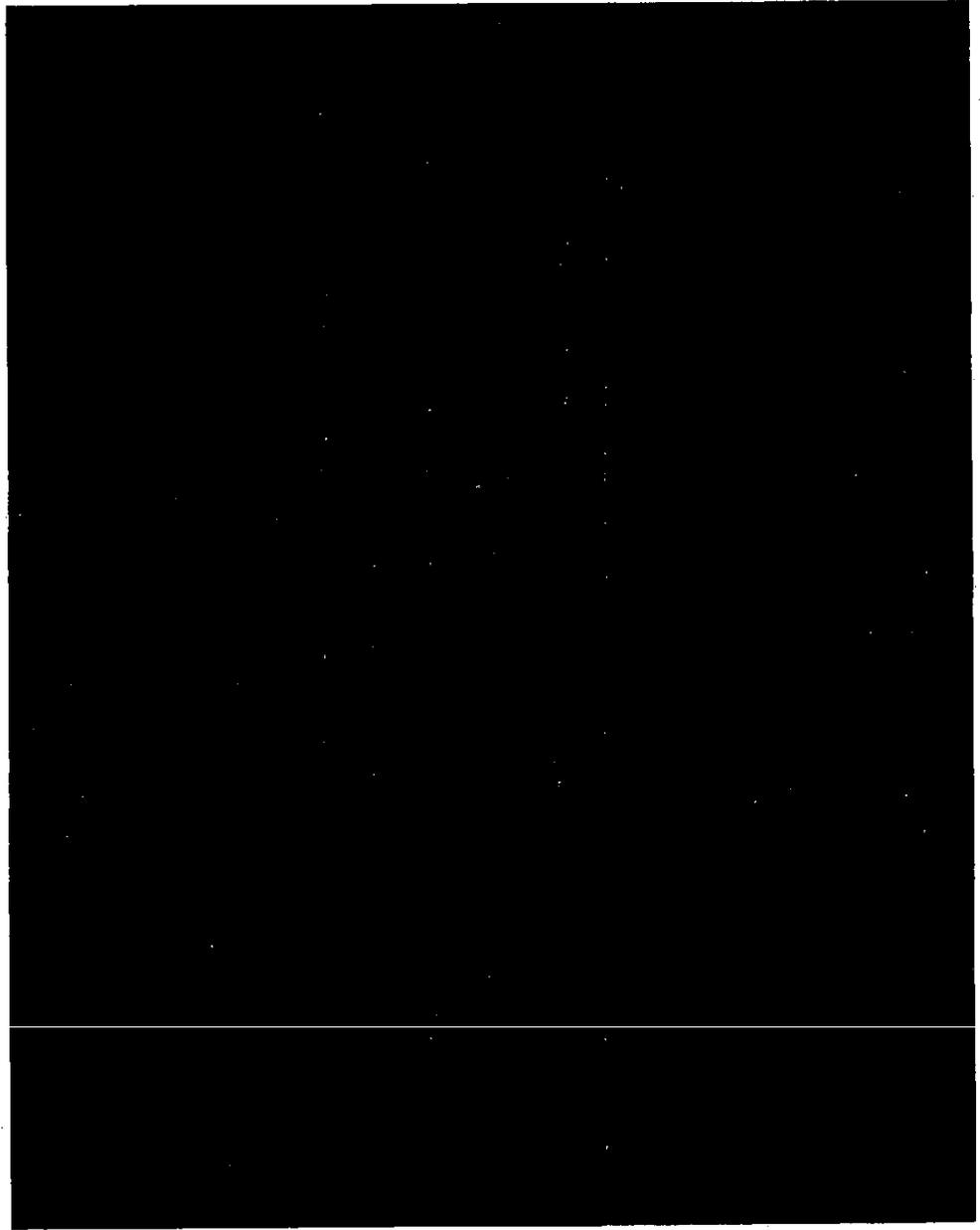


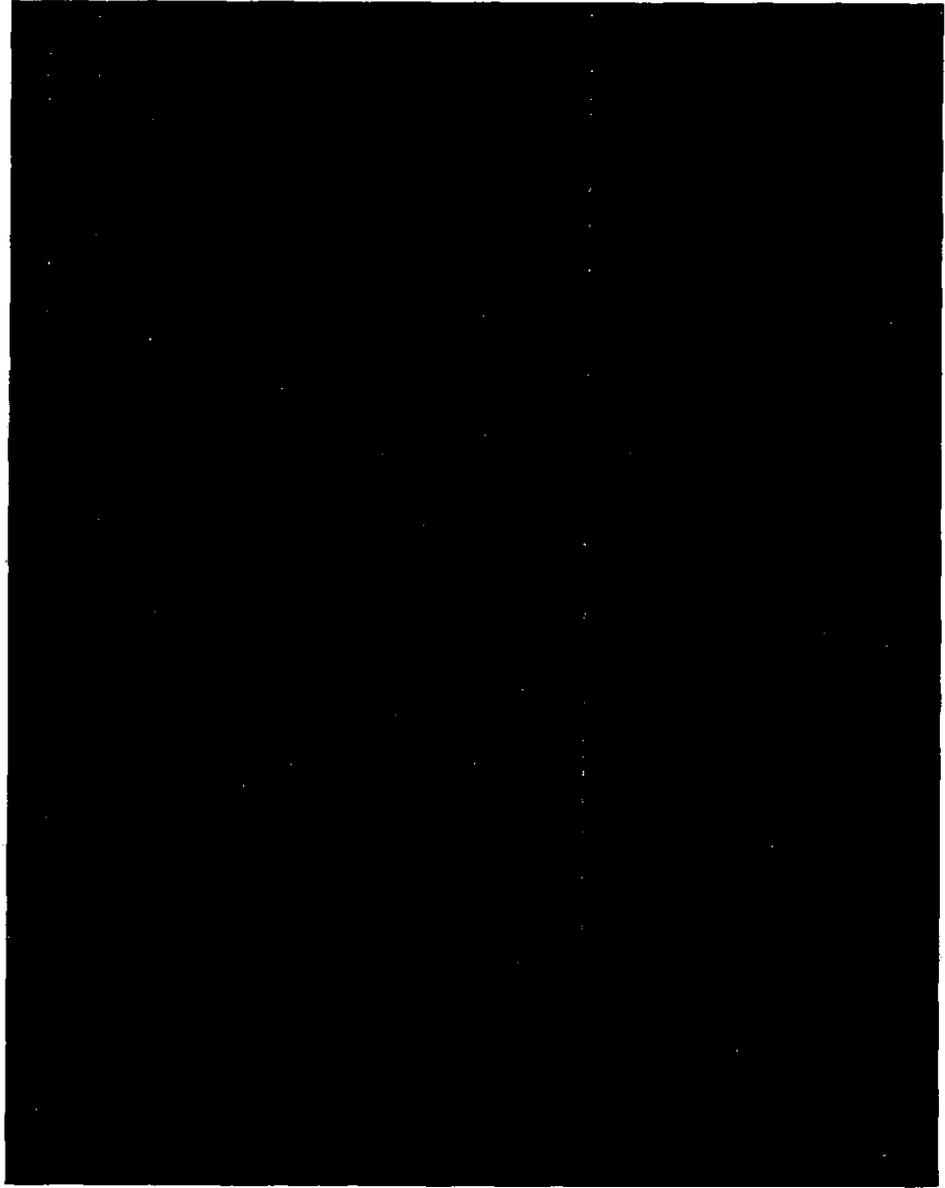
Fig. 9



**Fig. 10**



**Fig. 11**



**Fig. 12A**

**Fig. 12B**

45C1  
182-D758-187

125E1  
182-D1106-279

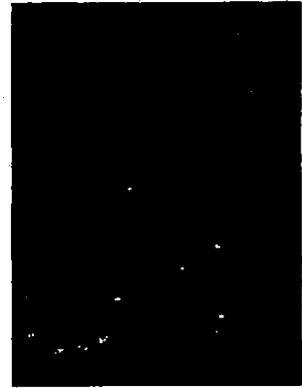
163E12  
182-D1106-294



KATO-III

166E2  
182-D1106-308

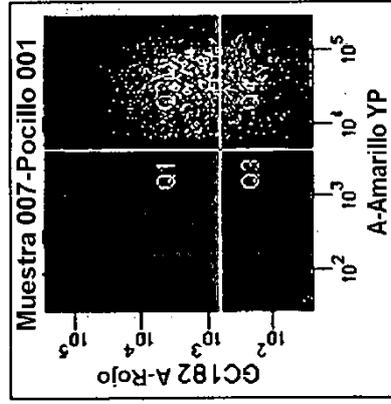
175D10  
182-D1106-362



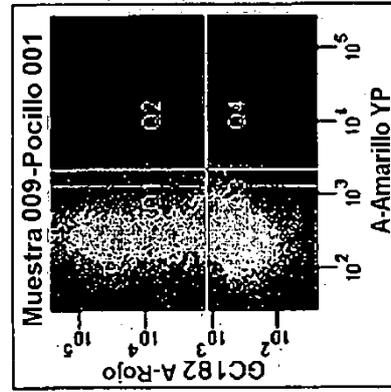
KATO-III

Fig. 13

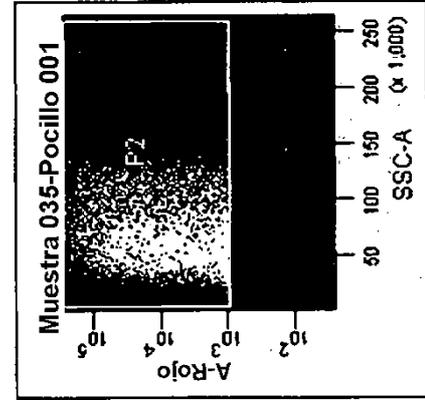
KATO-III



NUGC-4



163E12  
182-D1106-294



61C2  
182-D1106-67-D1



Fig. 15A

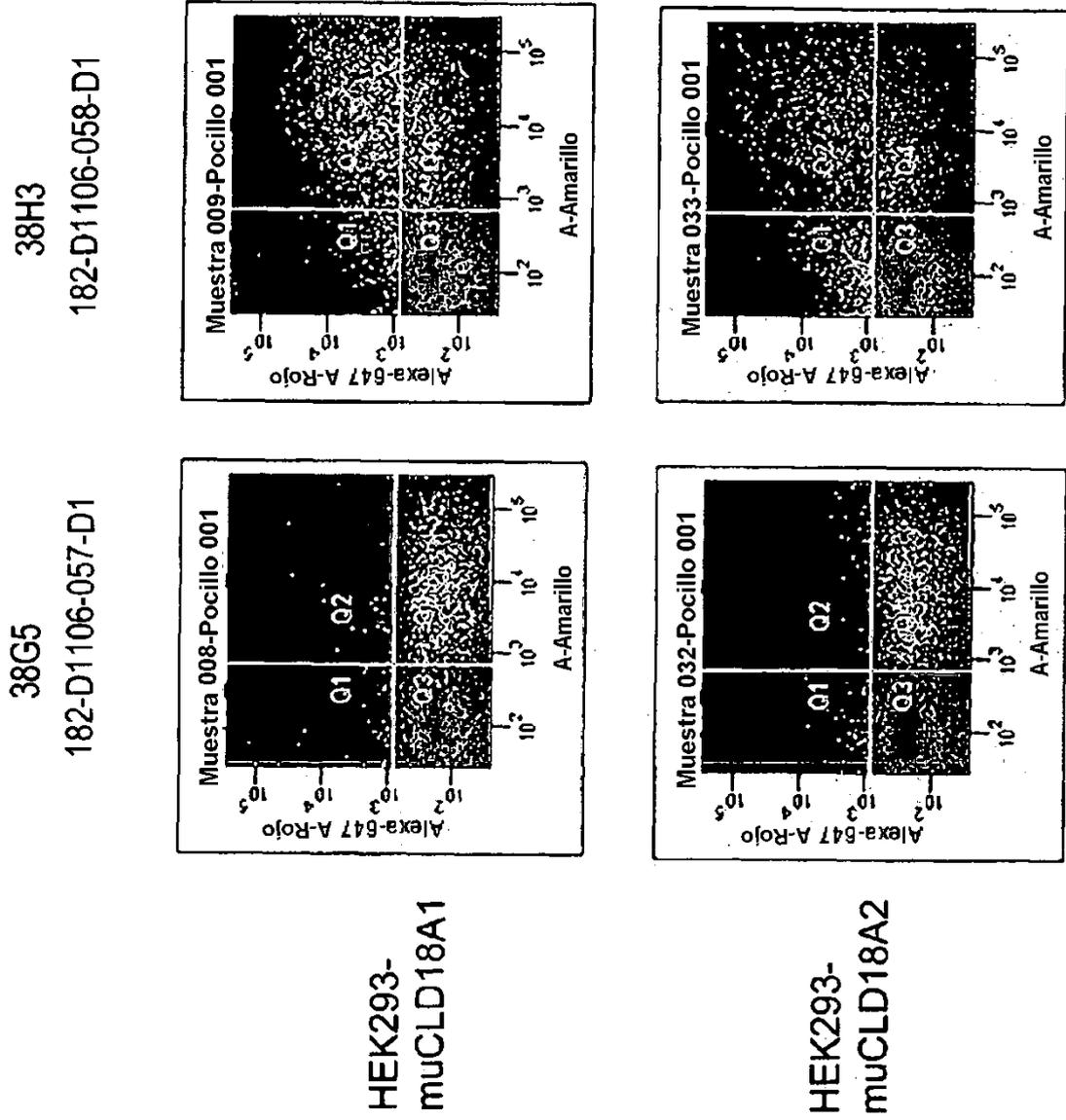
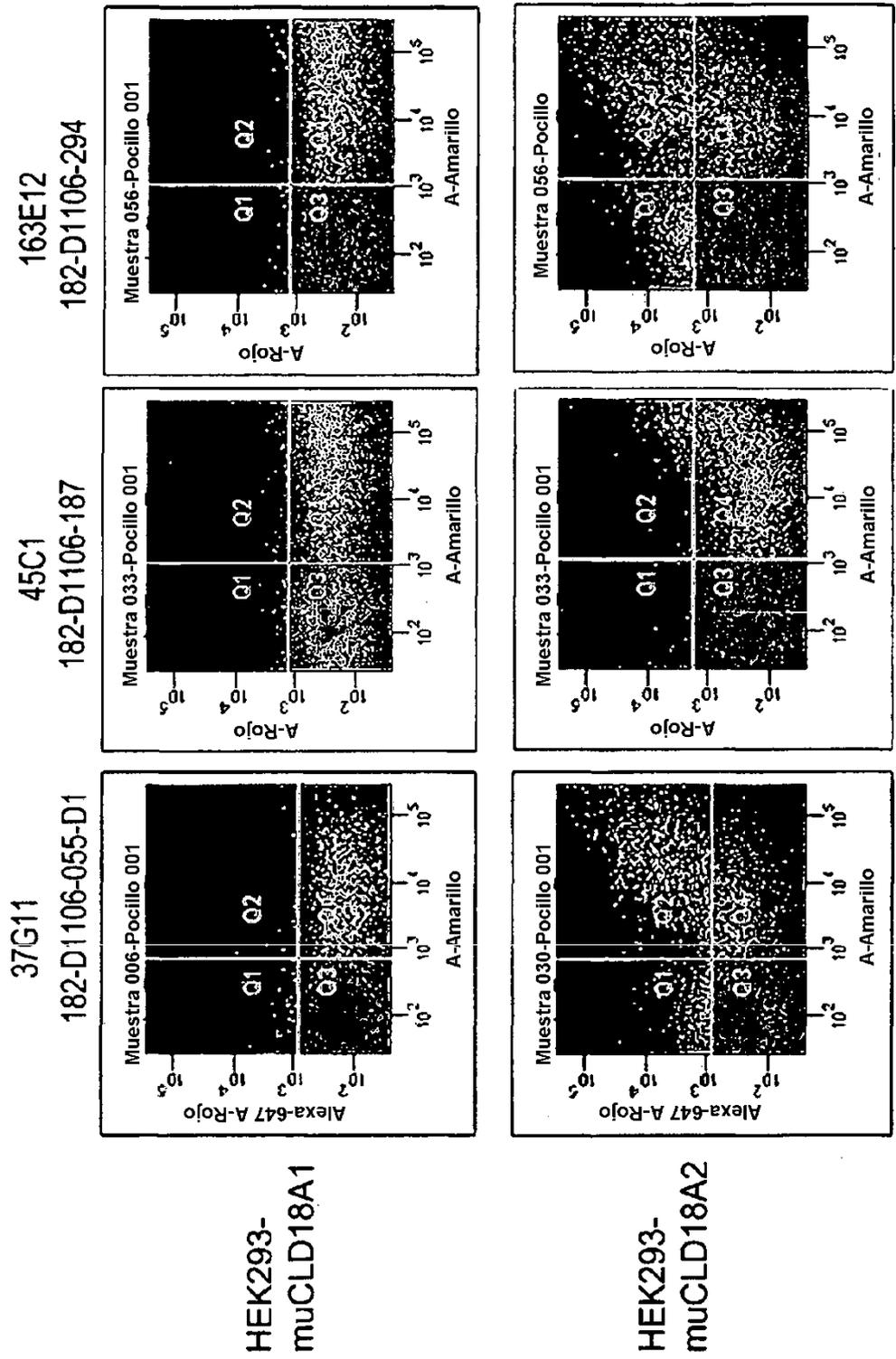


Fig. 15B



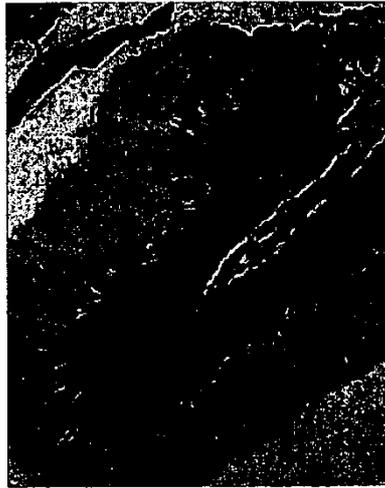
**Fig. 16**



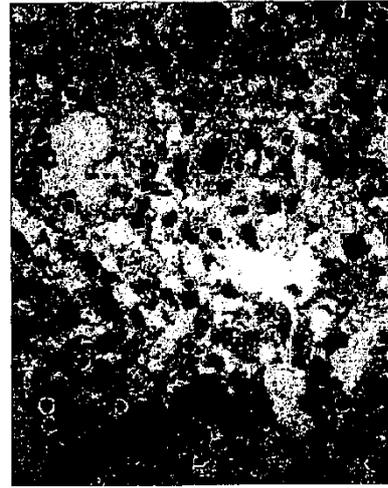
**Pulmón**



**Próstata**



**Estómago**

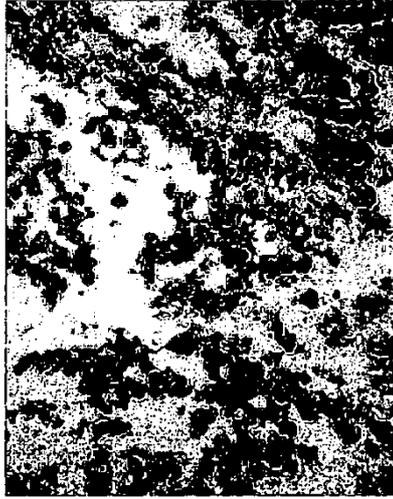


**Médula ósea**

**(A)**

**Fig. 16**

**Carcinomas de estómago**



**(B)**



**Carcinomas de pulmón**



Fig. 16

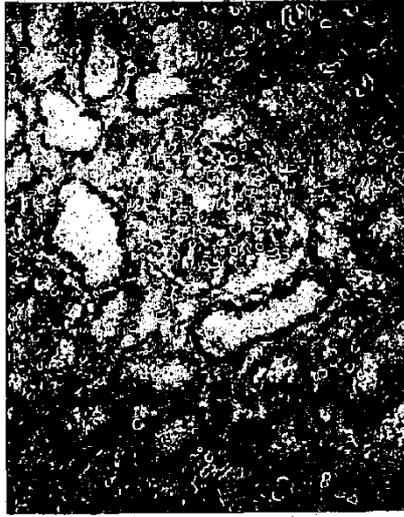
(c)

**Fig. 17**

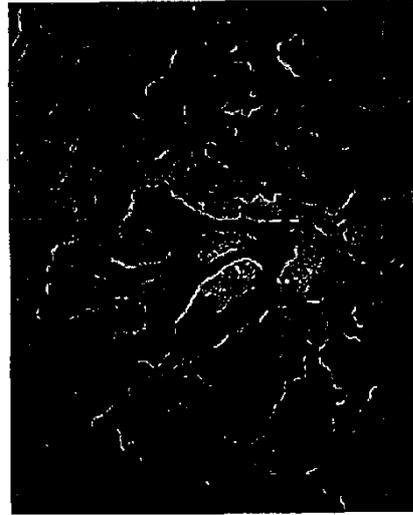


**(A)**

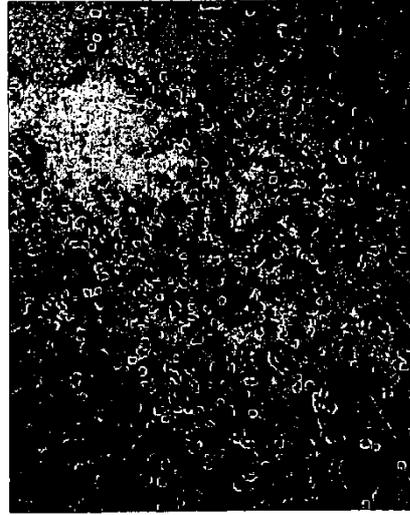
**Estómago**



**Riñón**



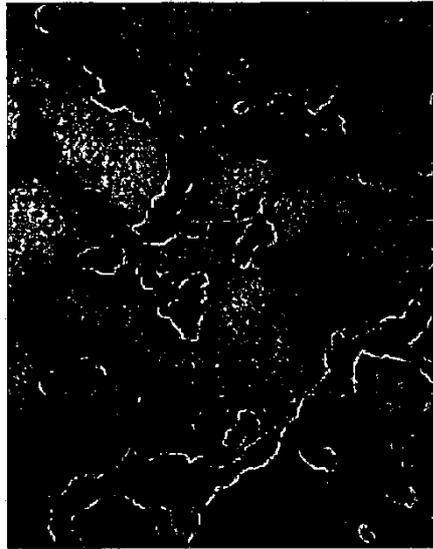
**Mama**



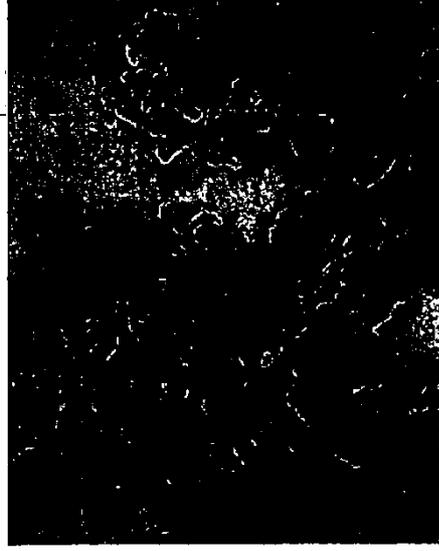
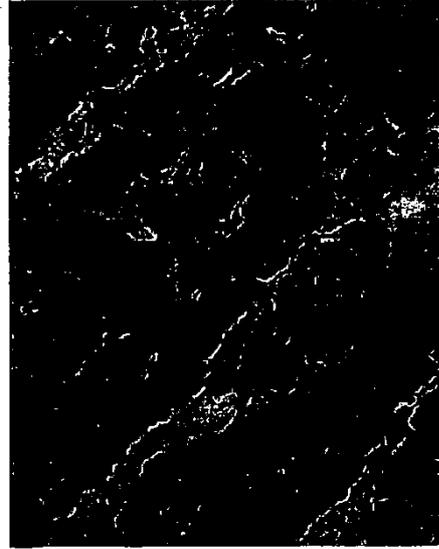
**Alvéolos pulmonares**

**Fig. 17**

**Carcinomas de estómago**



**(B)**



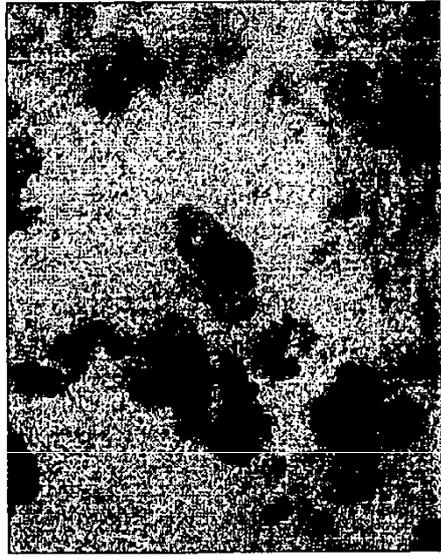
**Carcinomas de pulmón**

**Fig. 18A**

**Estómago normal**



**Carcinomas de estómago**

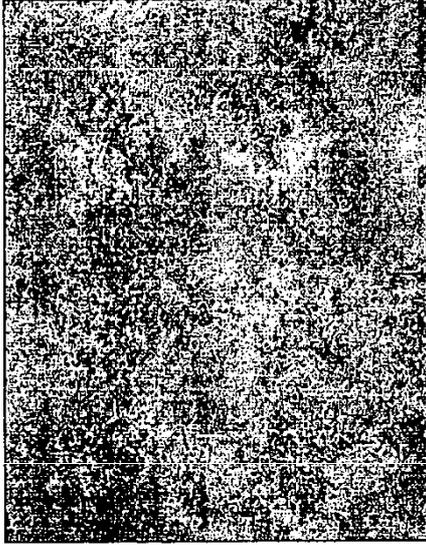


**Fig. 18B**

**Hek293-GC182A2**



**Hek293-simulado**



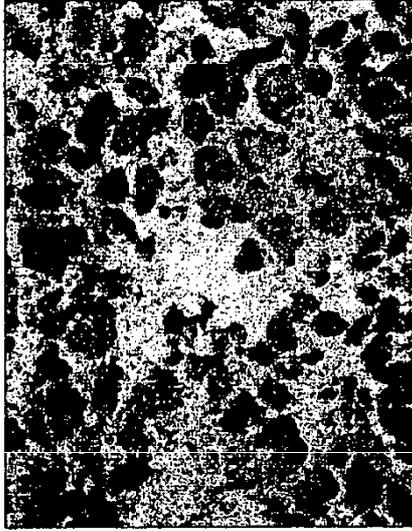
**Cáncer gástrico**



**Cáncer gástrico**

**Fig. 18C**

**Hek293-simulado**



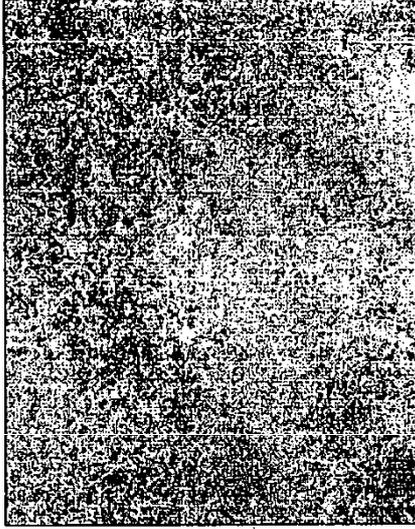
**Hek293-GC182A2**



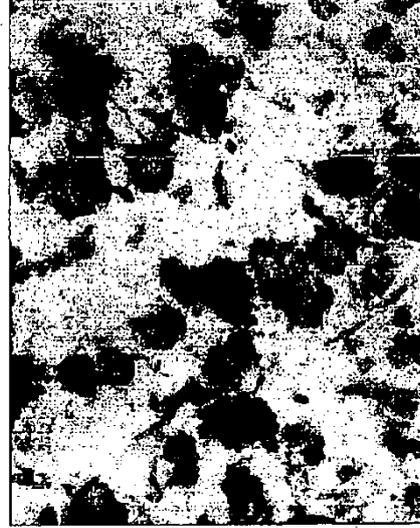
**C ncer g strico**

**Fig. 18D**

**Hek293-simulado**



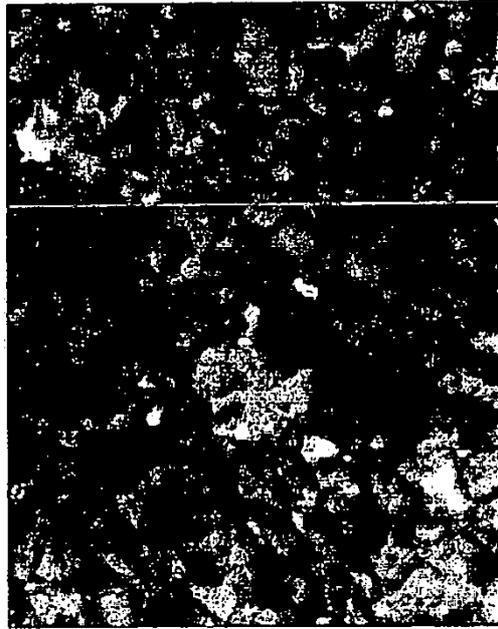
**Hek293-GC182A2**



**C ncer g strico**

**Fig. 18E**

**Hek293-GC182A2**



**Hek293-simulado**

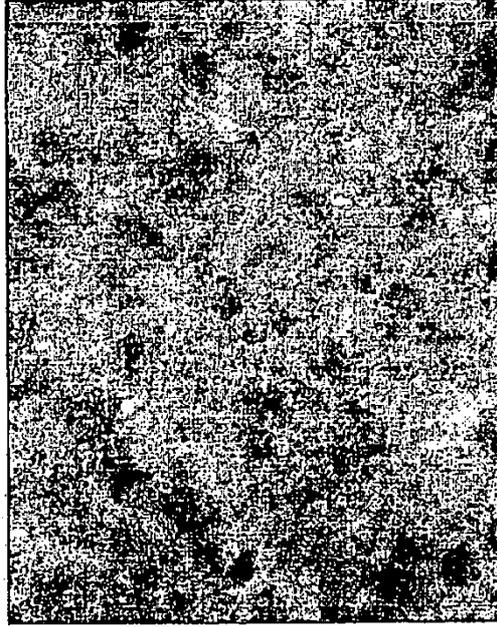


Fig. 19

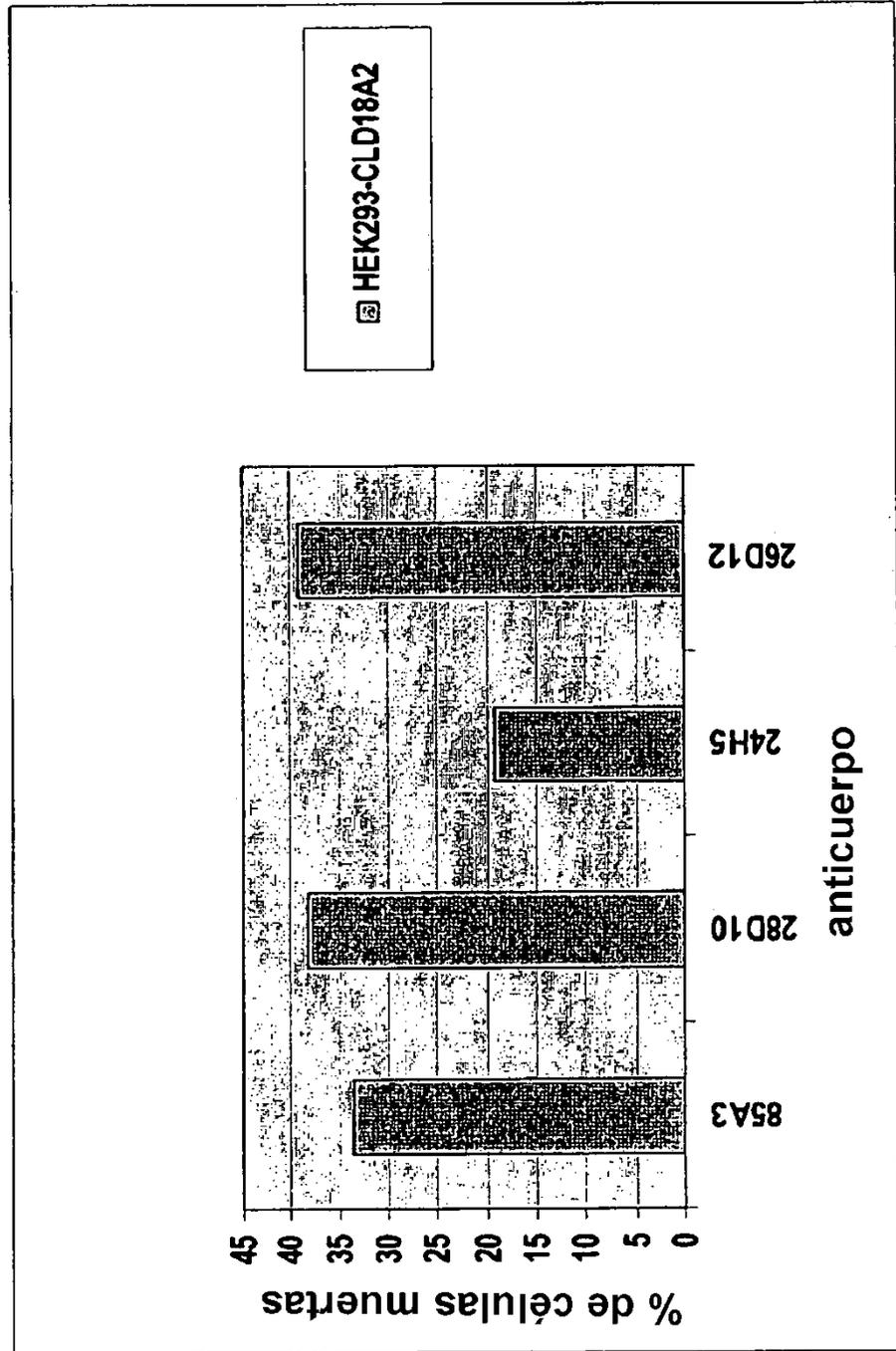


Fig. 20

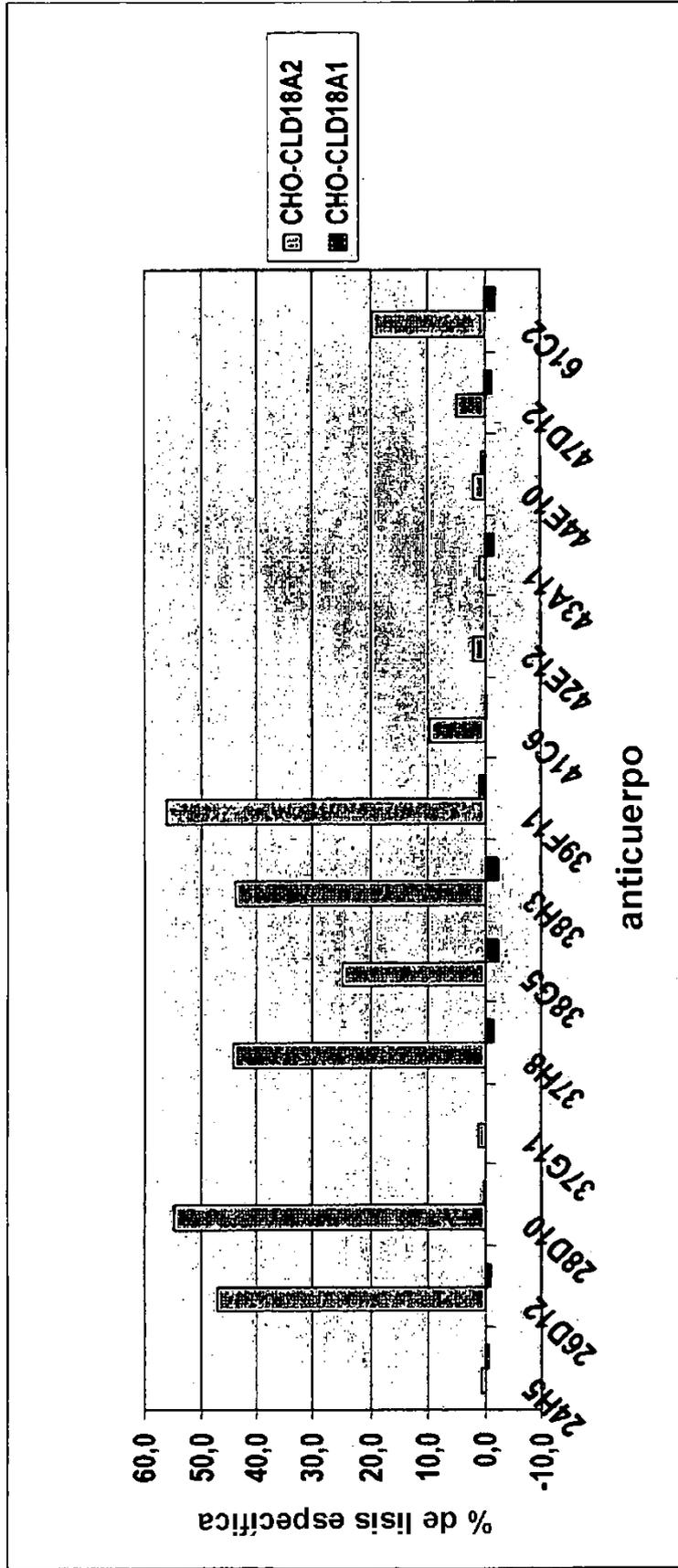


Fig. 21

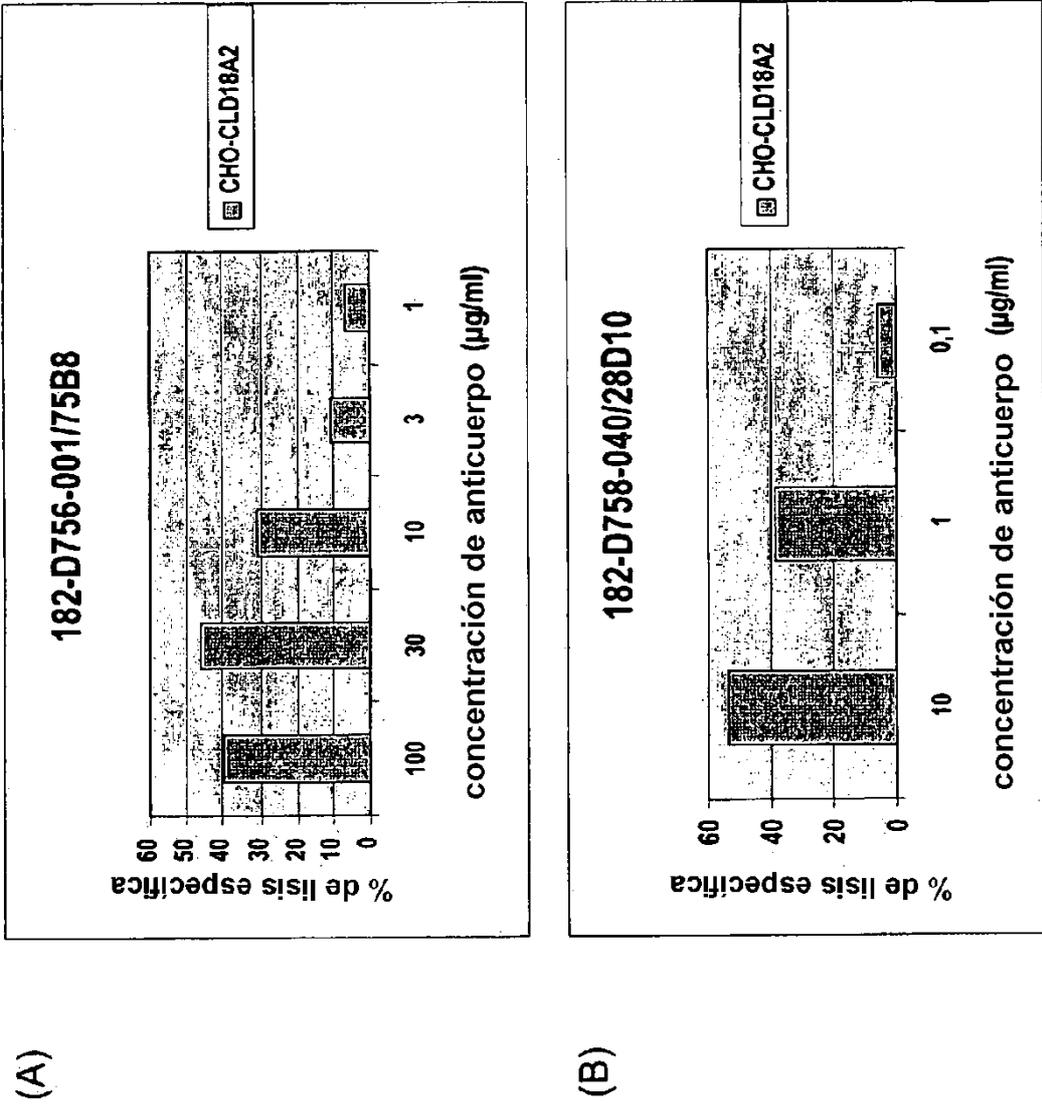


Fig. 21

(C)

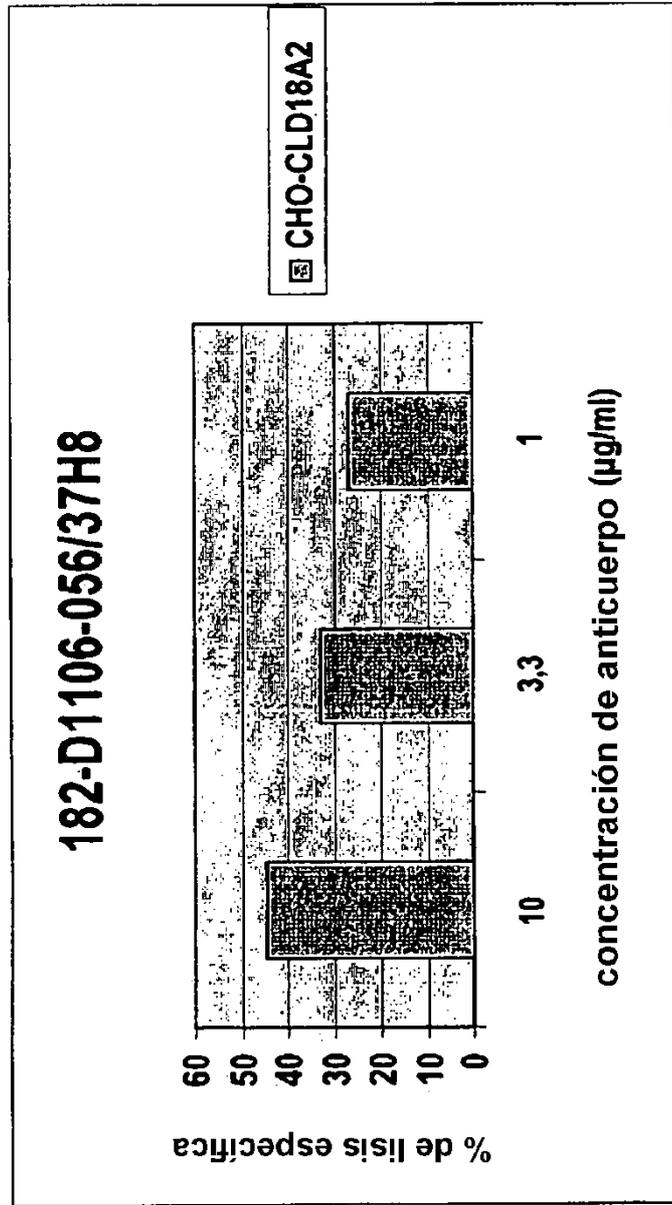


Fig. 22

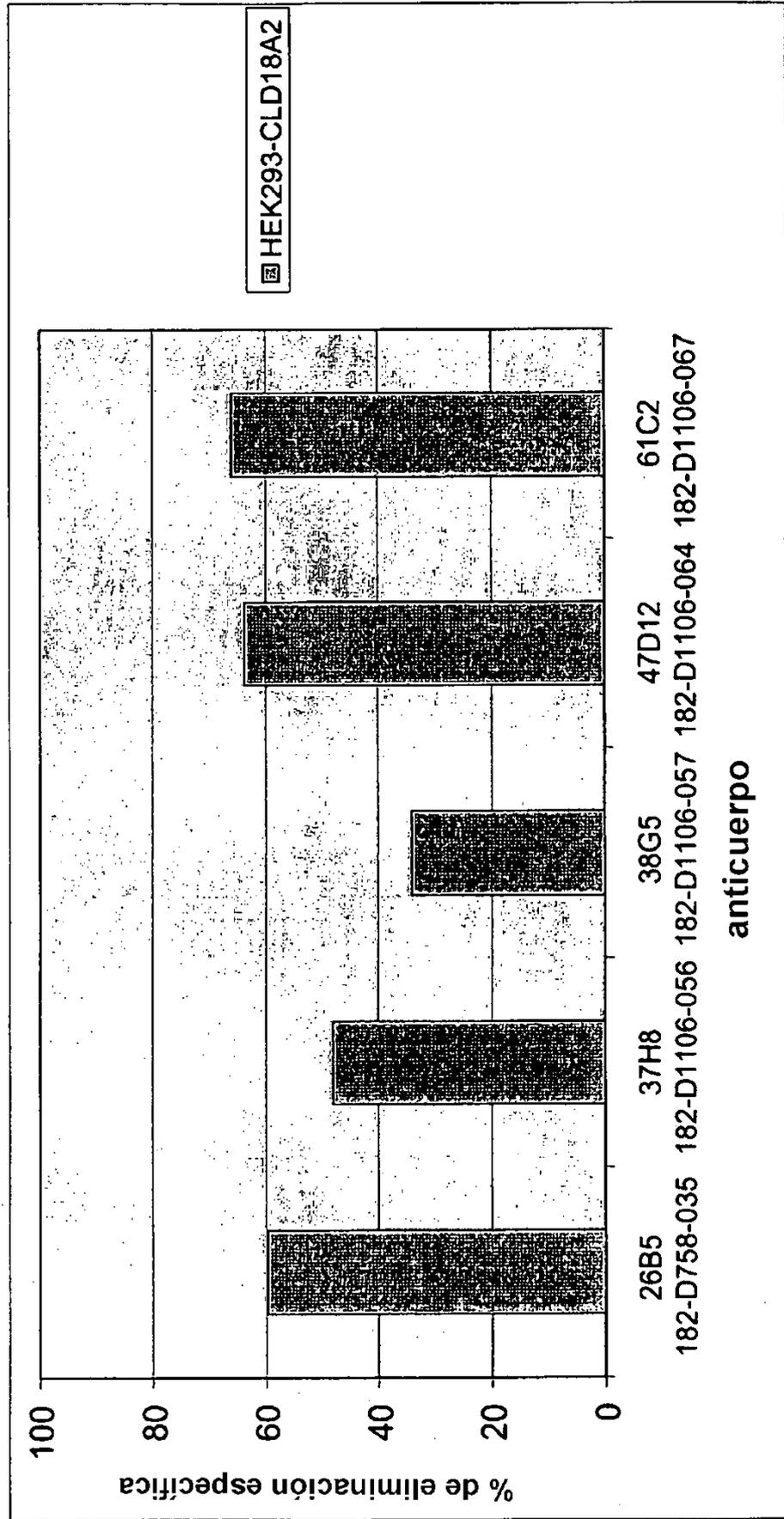


Fig. 23

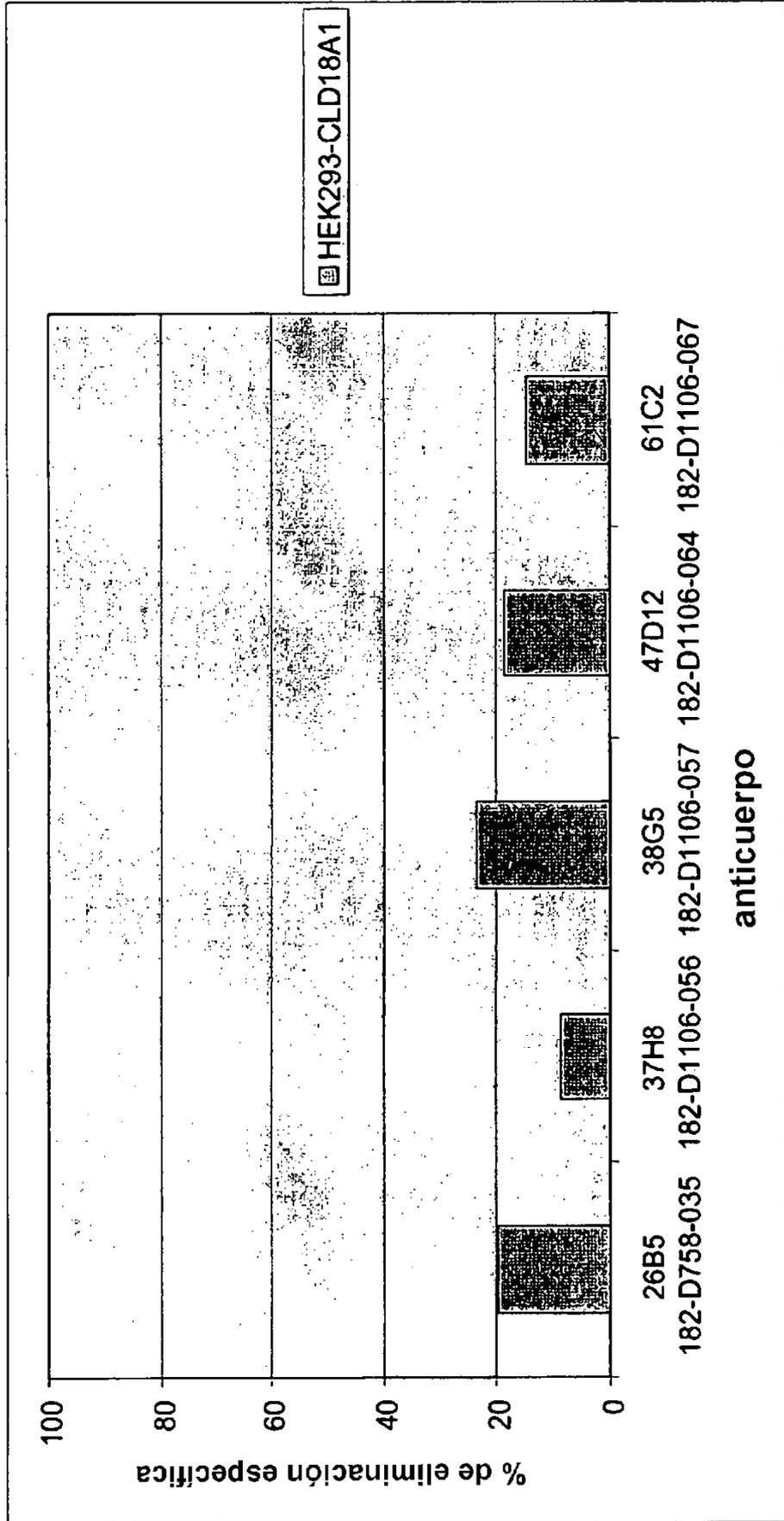


Fig. 24

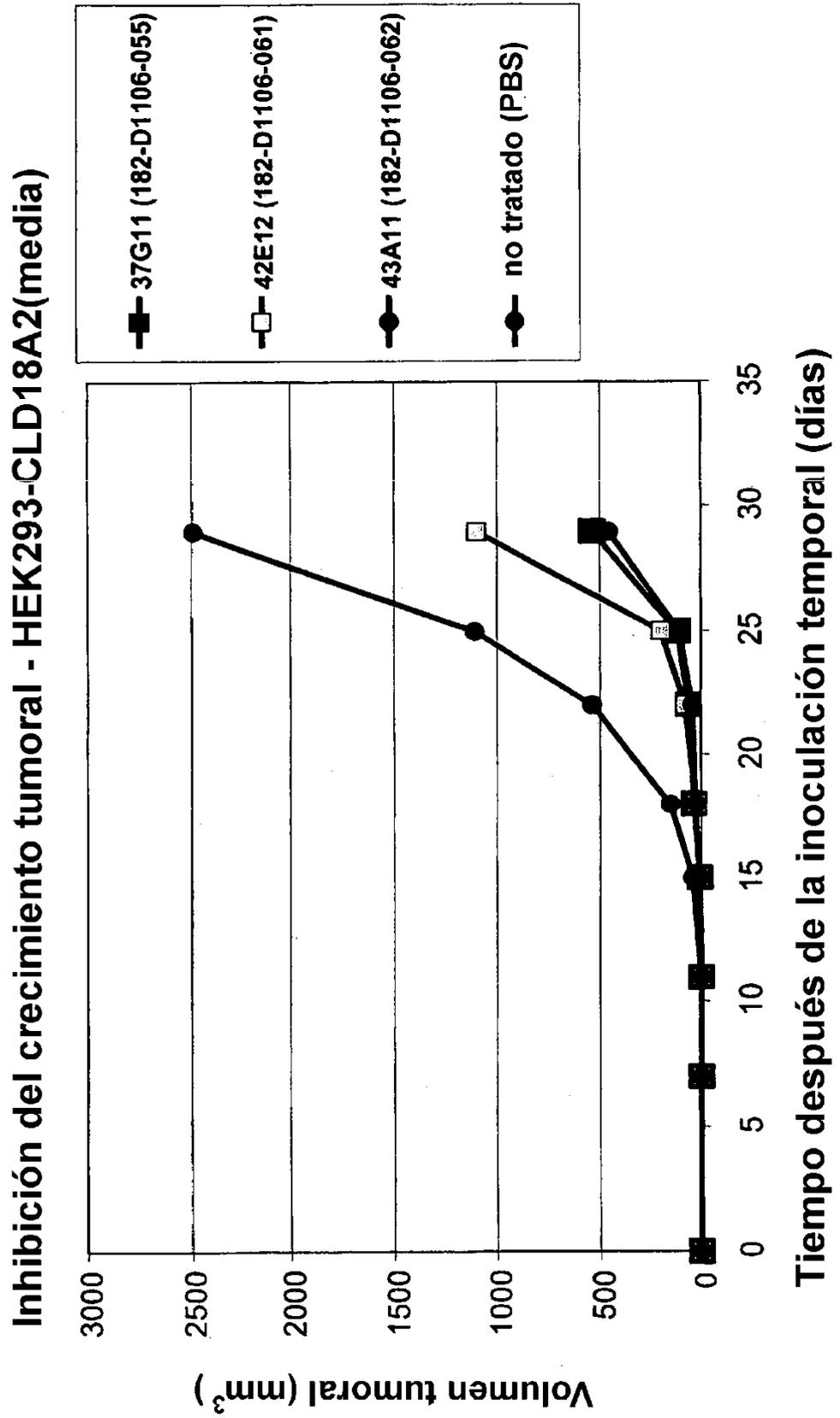


Fig. 25A

Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier

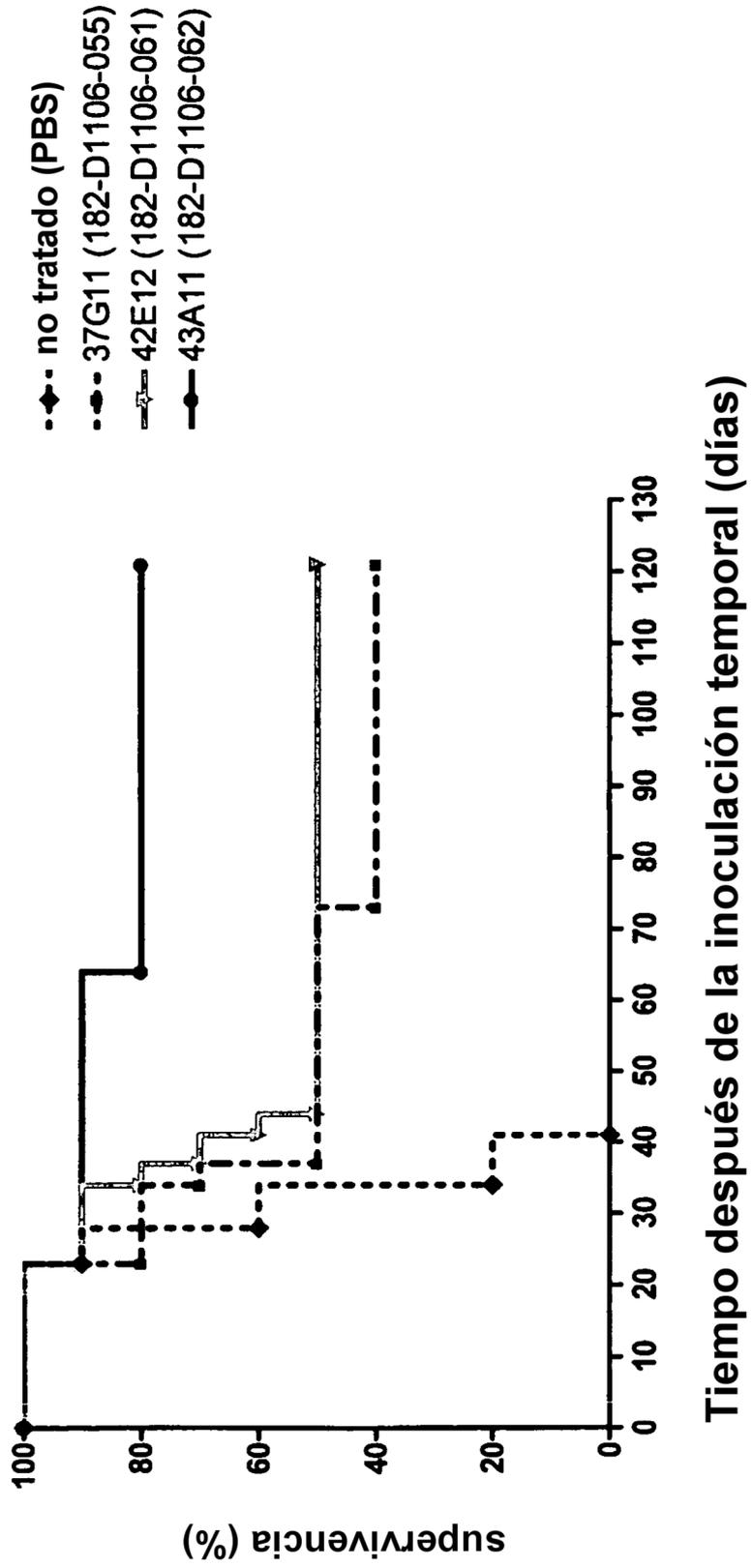


Fig. 25B

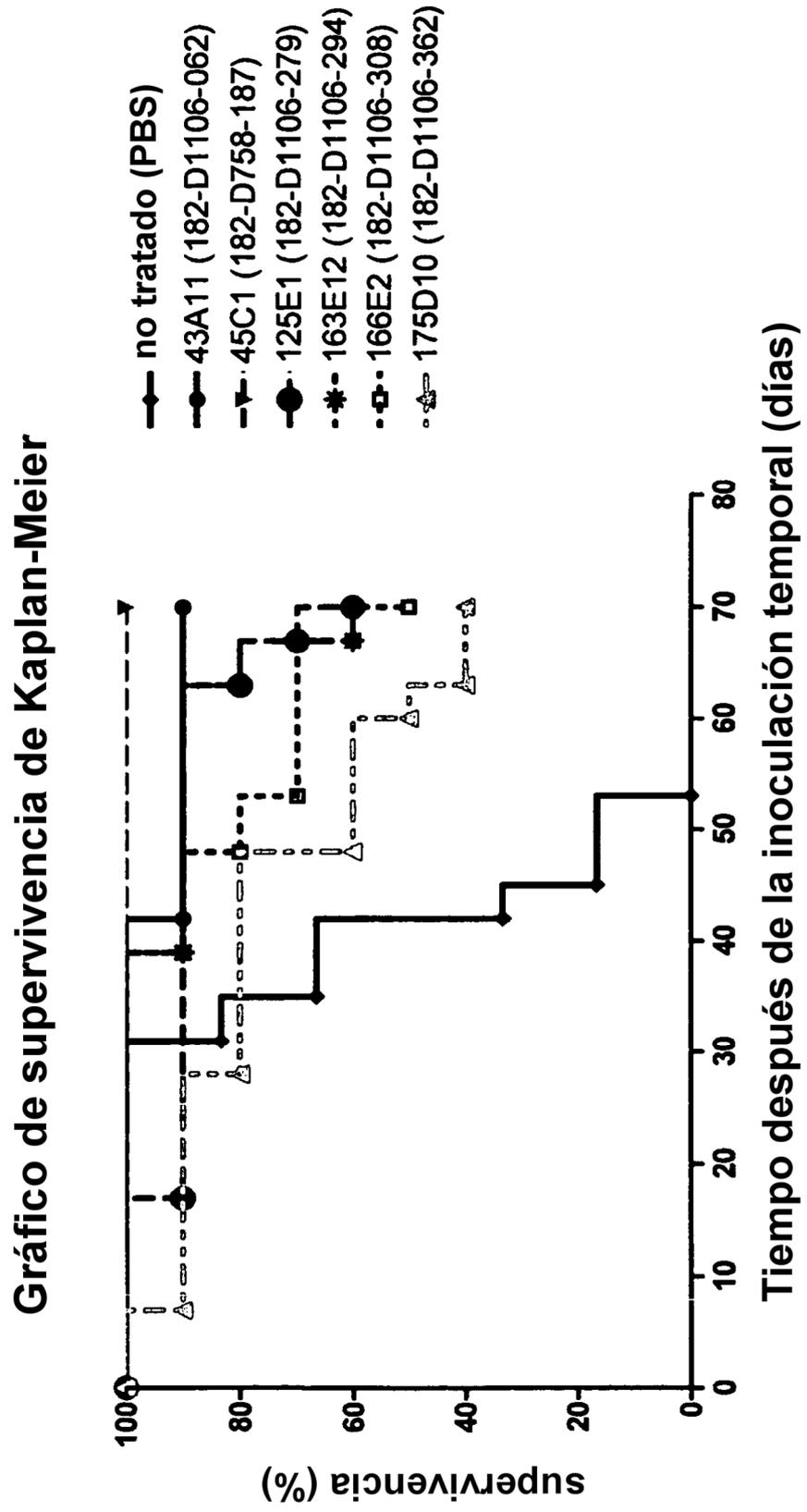


Fig. 26

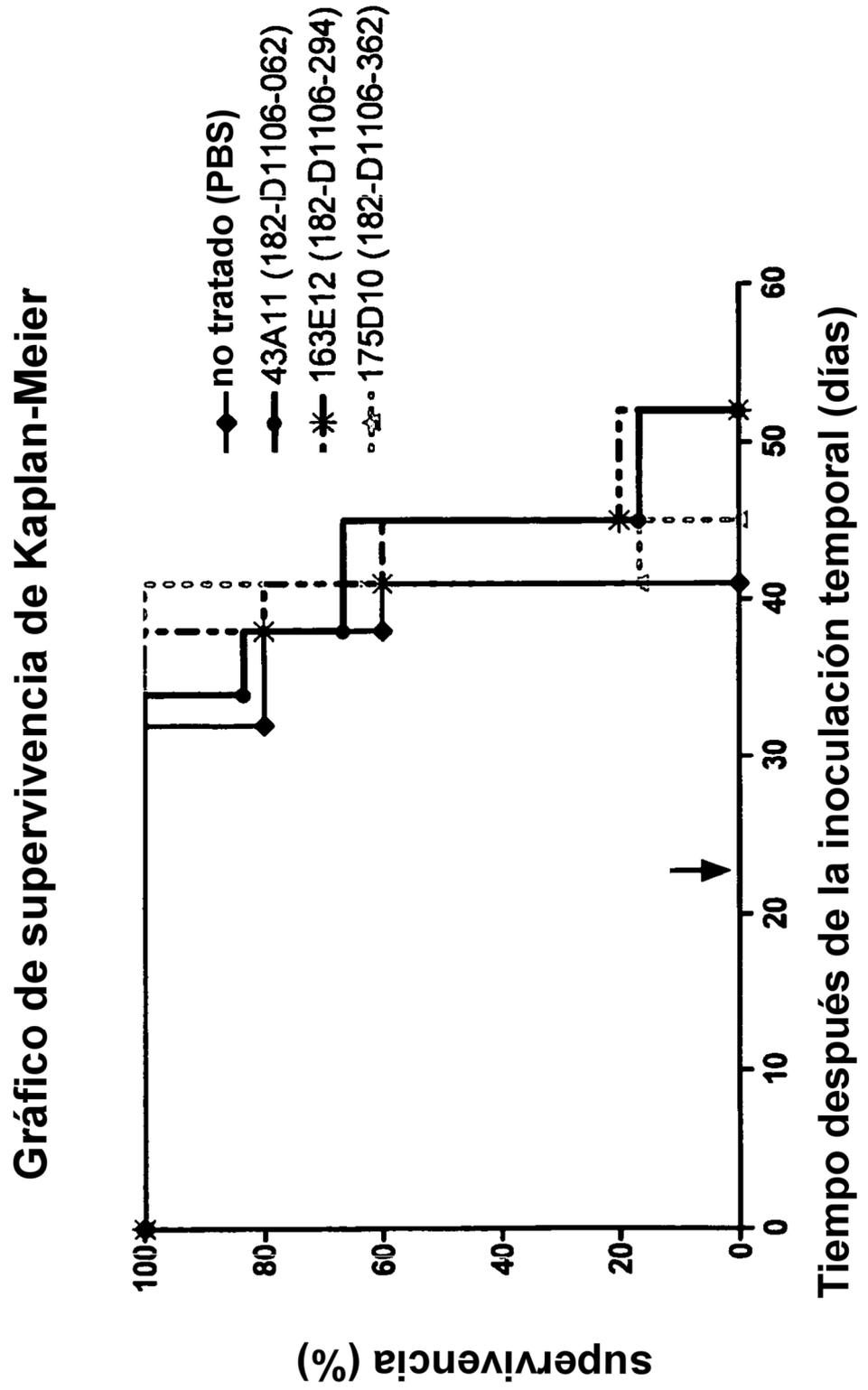


Fig. 27A

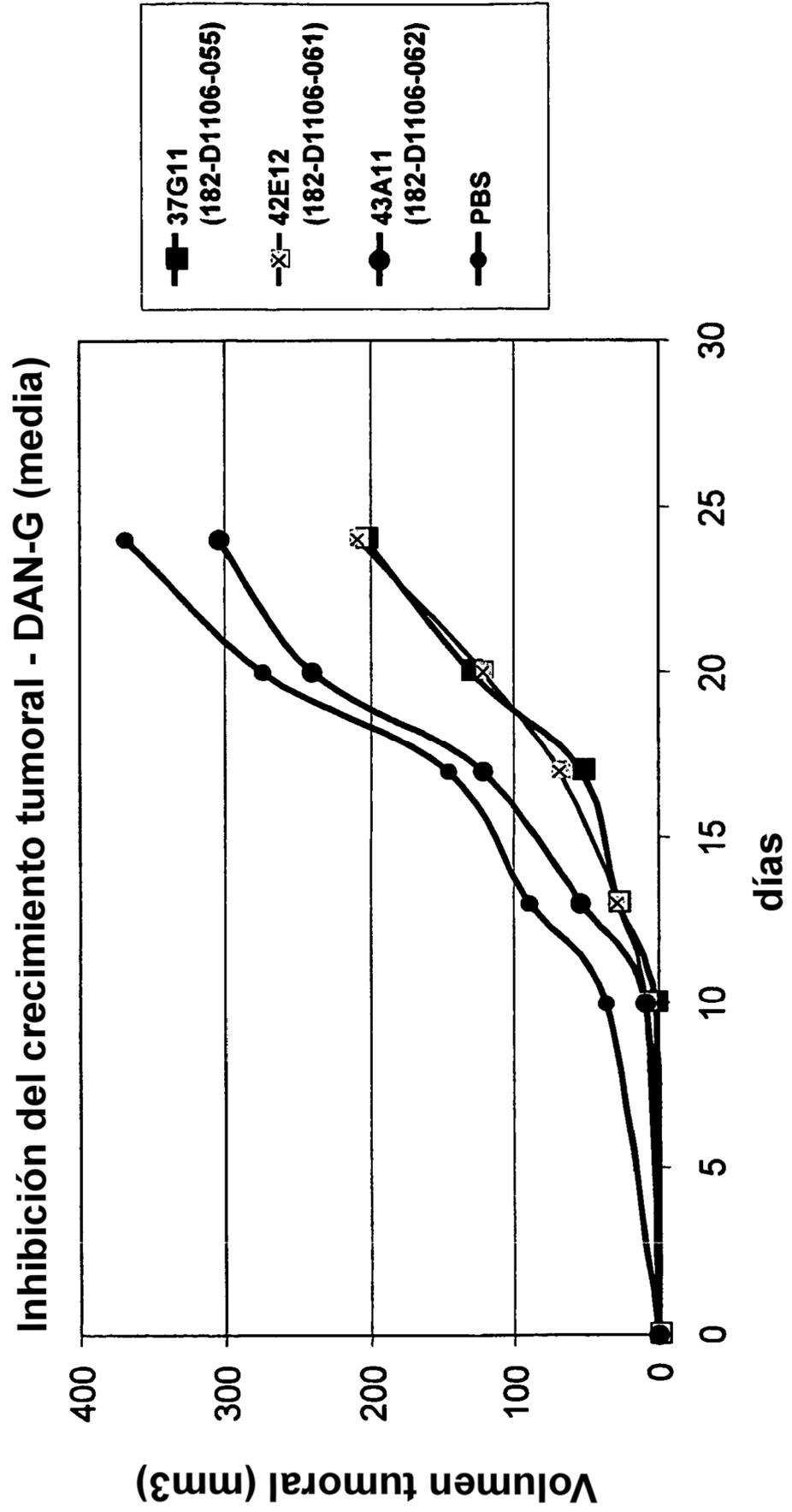
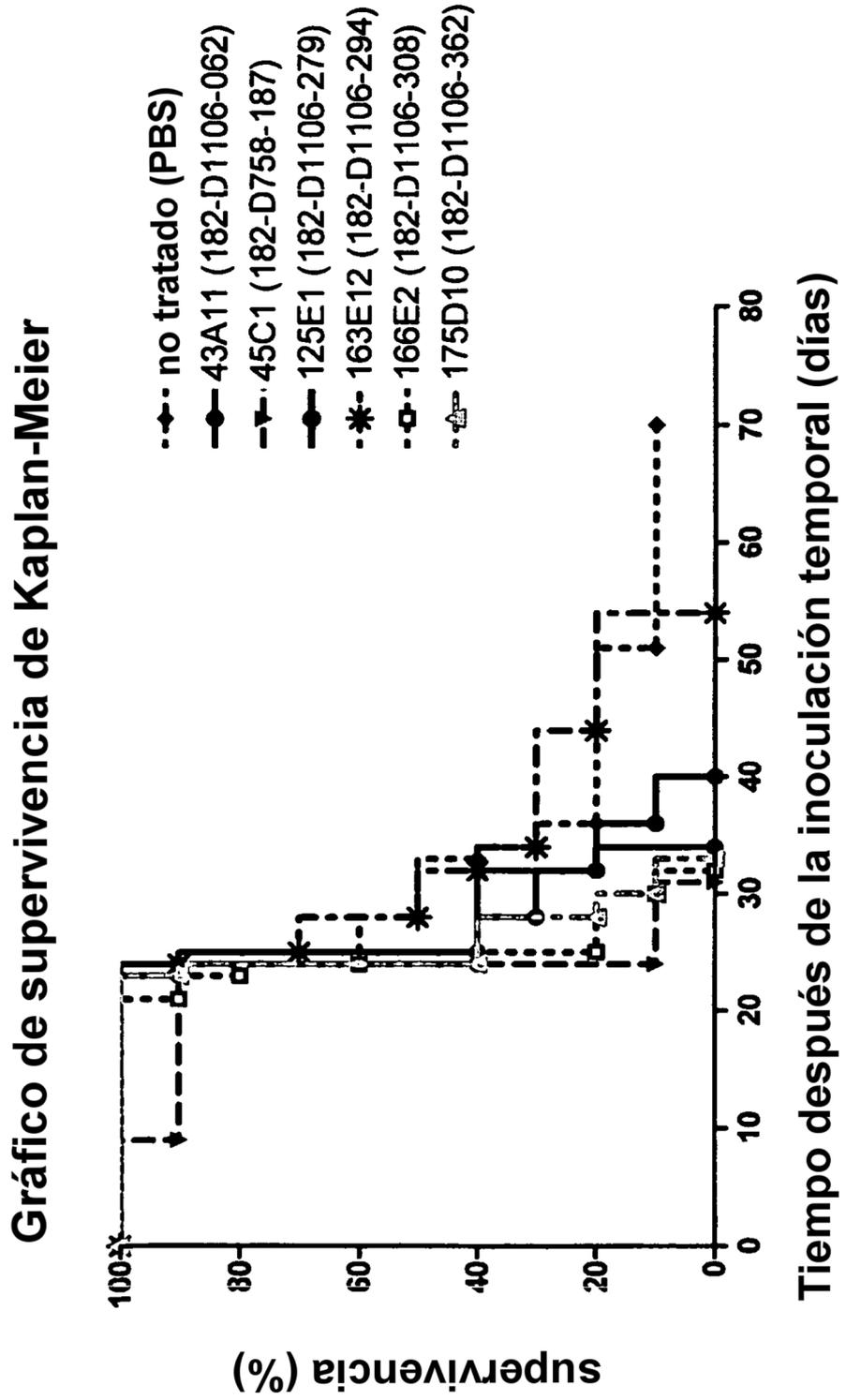
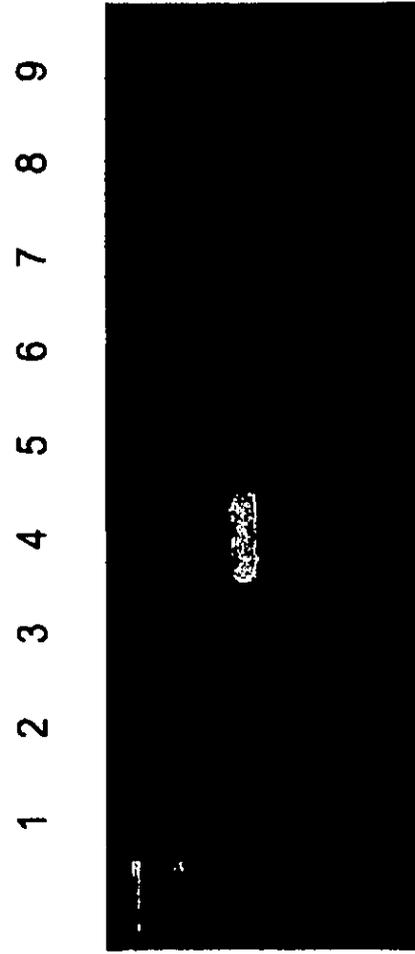


Fig. 27B



**Fig. 28**



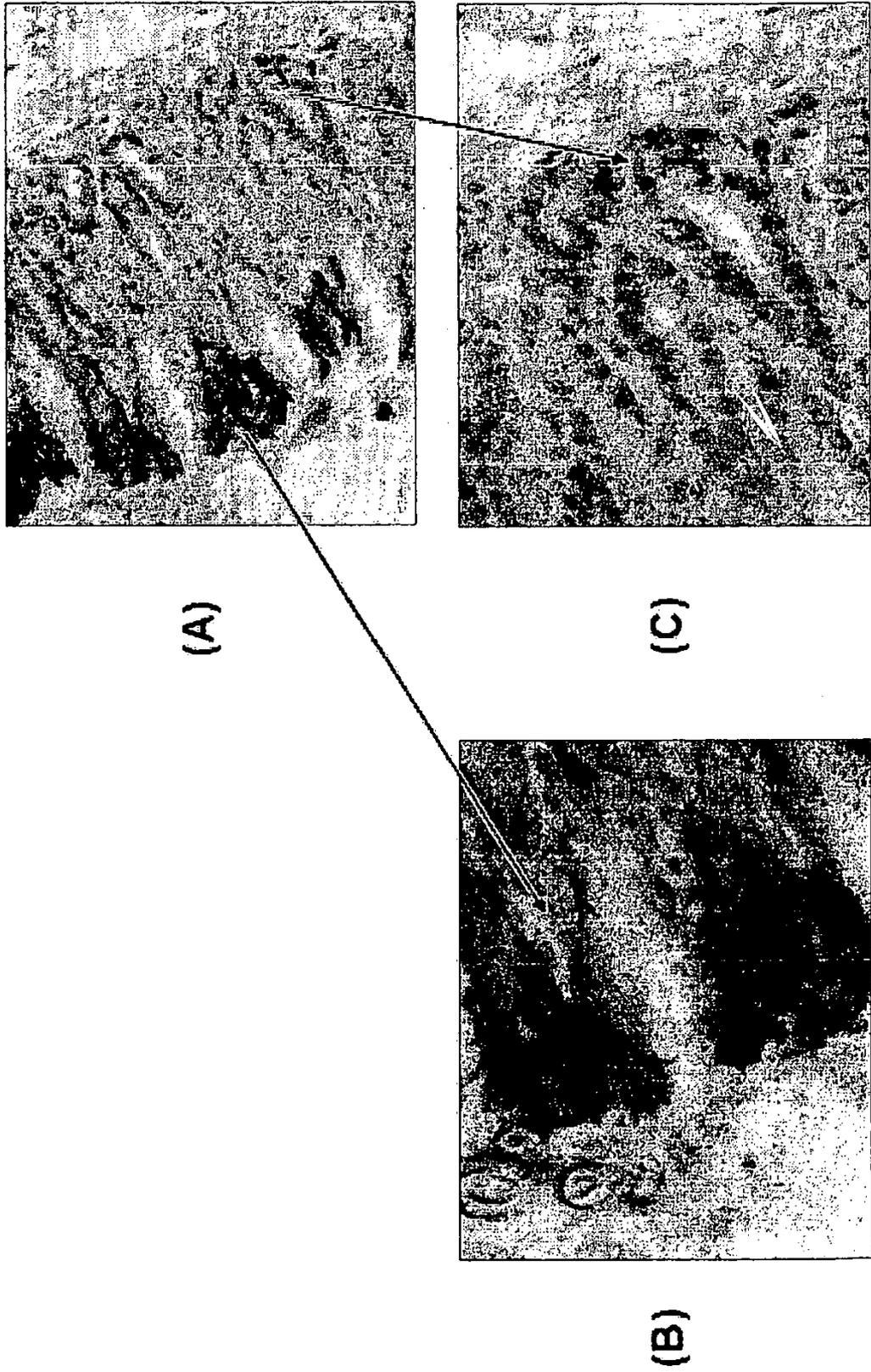
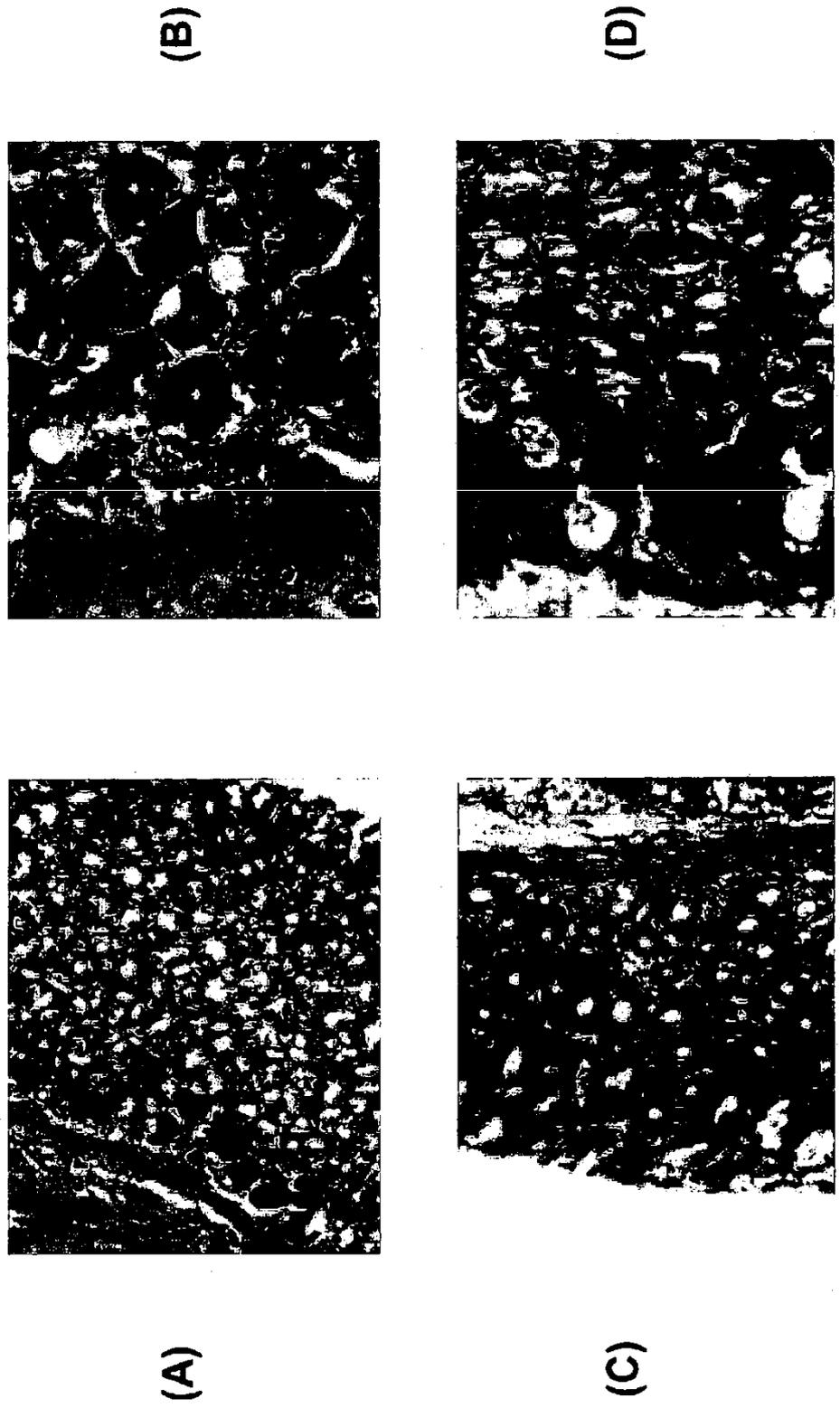


Fig. 29

Fig. 30



**Fig. 31A**

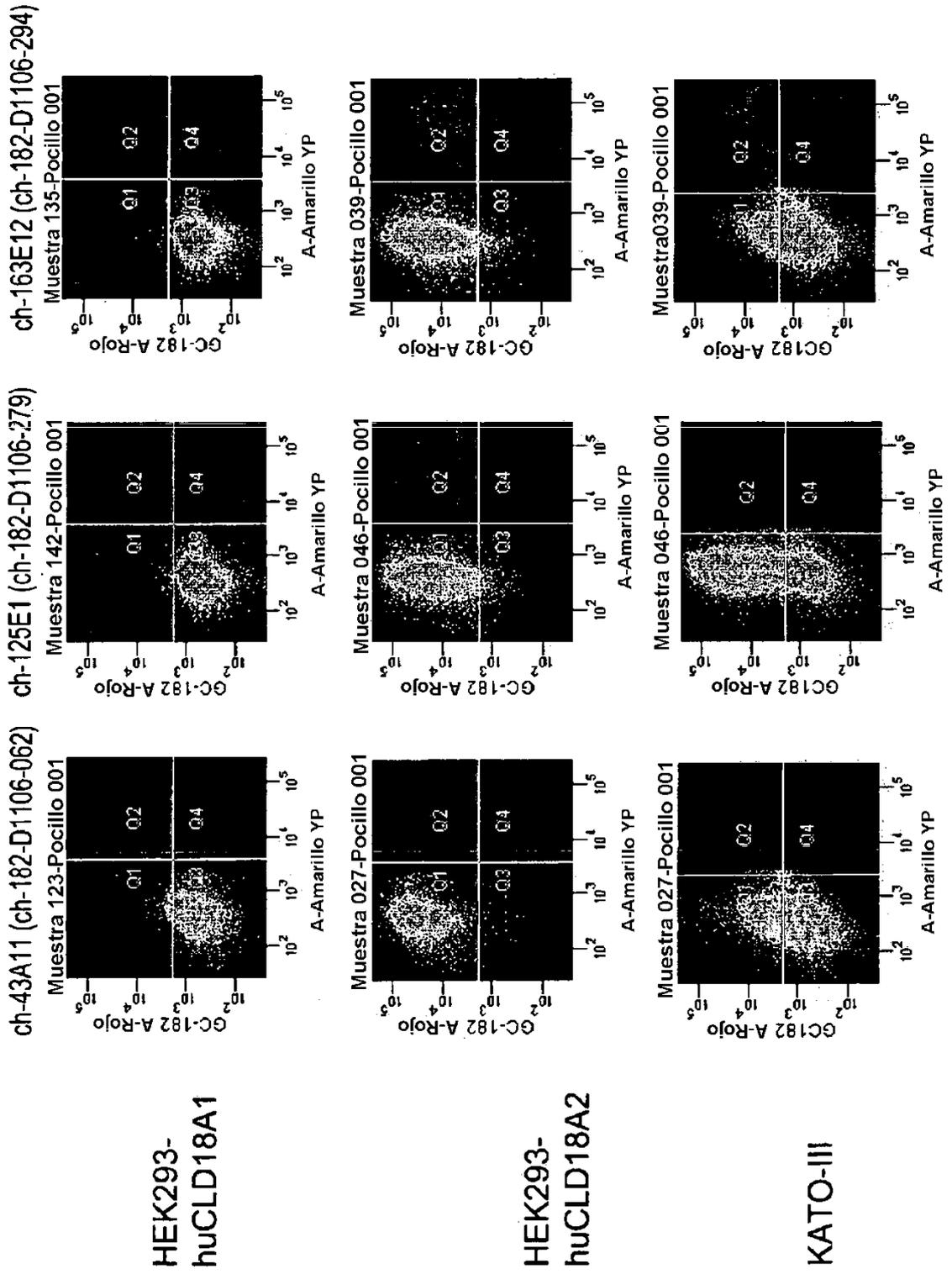




Fig. 32

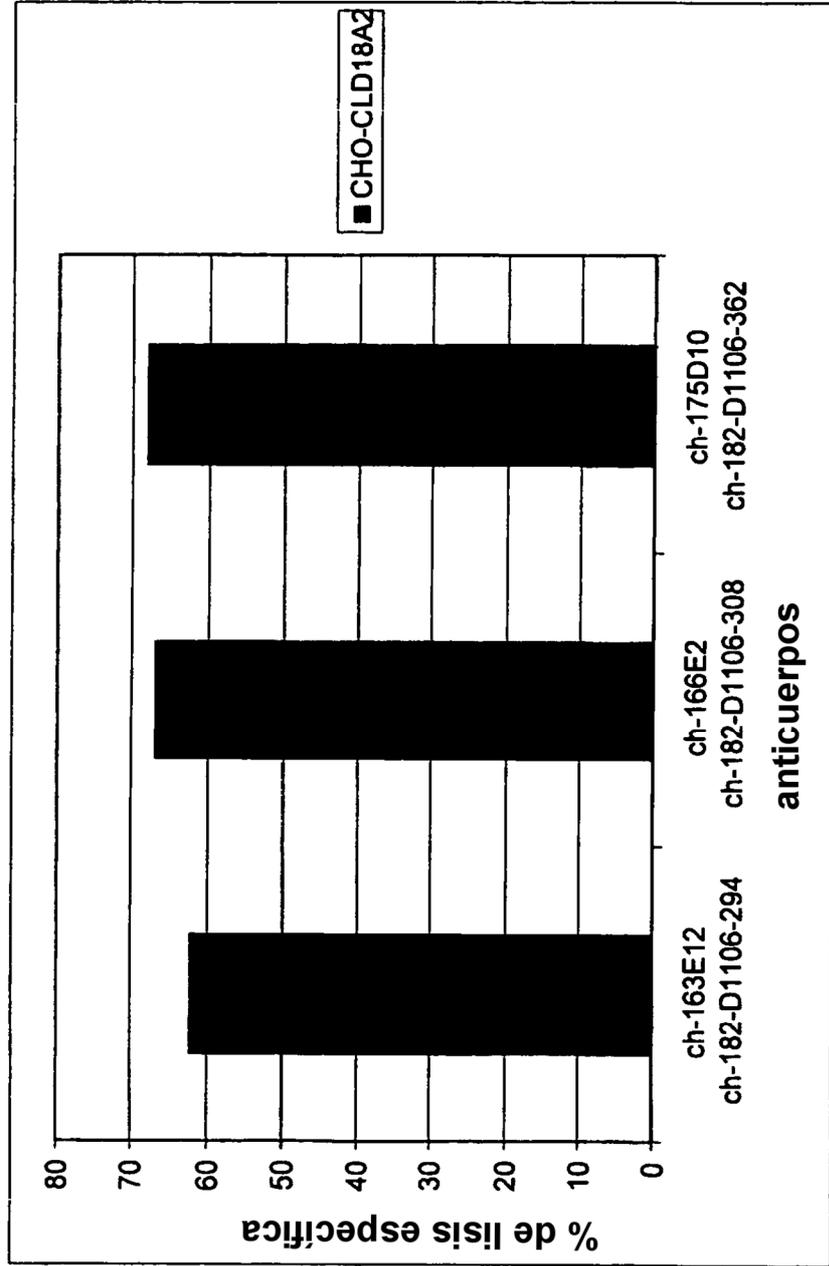


Fig. 33

