

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 289**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.05.2004 E 14178061 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2853272**

54 Título: **Uso terapéutico de anticuerpos anti-CS1**

30 Prioridad:

08.05.2003 US 469211 P

29.03.2004 US 557622 P

29.03.2004 US 557621 P

29.03.2004 US 557620 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2017

73 Titular/es:

ABBVIE BIOTHERAPEUTICS INC. (100.0%)
1500 Seaport Boulevard
Redwood City, CA 94063, US

72 Inventor/es:

WILLIAMS, MARN;
TSO, YUN J.;
LANDOLFI, NICOLAS F.;
LIU, GAO y
POWERS, DAVID B.

74 Agente/Representante:

CURELL AGUILÁ, Mireia

ES 2 643 289 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

Uso terapéutico de anticuerpos anti-CS1.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al campo de antagonistas y anticuerpos en el tratamiento de enfermedades, incluyendo enfermedades relacionadas con enfermedades autoinmunitarias y cáncer, y a métodos para detectar, identificar y modular estas enfermedades.

10

Antecedentes de la invención

La expresión incrementada de inmunoglobulina es una característica de muchas enfermedades. La secreción de inmunoglobulina en grandes cantidades provoca una variedad de trastornos, incluyendo síndrome de hiperviscosidad, un trastorno debilitante que da como resultado fatiga, cefaleas, disnea, confusión mental, dolor torácico, daño e insuficiencia renal, problemas de visión y fenómeno de Raynaud (mala circulación sanguínea, particularmente dedos de las manos, dedos de los pies, nariz y orejas). La enfermedad por crioglobulina, y la crioglobulinemia mixta, la hipergammaglobulinemia, el síndrome de Sjogren, el liquen mixodematoso, y la enfermedad de Gaucher son ejemplos de enfermedades asociadas con la expresión incrementada de inmunoglobulinas.

15

20

La expresión incrementada de inmunoglobulina dirigida a proteínas propias es un rasgo distintivo de las enfermedades autoinmunitarias. La enfermedad autoinmunitaria es un fallo del sistema inmunitario para reconocer los autoantígenos como propios. En enfermedades autoinmunitarias, el sistema inmunitario se ataca erróneamente a sí mismo, dirigiéndose contra células, tejidos y órganos, dando eventualmente como resultado la destrucción de sistemas fisiológicos. La autoinmunidad y las enfermedades autoinmunitarias tienen un origen multifactorial, estando implicados la predisposición genética, los factores del hospedante (por ejemplo debilidad de los controles inmunorreguladores, defectos en células T supresoras, o estimulación policlonal de células B resistentes a controles), los factores medioambientales y los mecanismos accionados por antígenos en el desarrollo de autoinmunidad y producción de autoanticuerpos para autoantígenos.

25

30

Los trastornos gastrointestinales y el lupus eritematoso sistémico (SLE) son dos ejemplos de enfermedades autoinmunitarias. La enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), un subgrupo de trastornos gastrointestinales, es un grupo de trastornos incurables que afecta a aproximadamente 4 millones de personas a nivel mundial. La etiología de la enfermedad inflamatoria recurrente del intestino es actualmente desconocida. Las teorías incluyen una destrucción de células gastrointestinales, incluyendo linfocitos, mediada por el sistema autoinmunitario. Se ha demostrado previamente la agregación homotípica anormal en modelos de enfermedad inflamatoria heredable del intestino, y se ha mostrado que las mutaciones en NOD2, un gen implicado en trastornos autoinmunitarios, predisponen a los pacientes a la enfermedad de Crohn. Ni, J. *et al.*, Immunological abnormality in C3H/HeJ mice with heritable inflammatory bowel disease, *Cell Immunol.* 169:7-15 (1996); Ogura, Y. *et al.*, A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's Disease, *Nature* 411: 603-606 (2001).

35

40

Las IBD afectan muy a menudo al intestino delgado y al colon, pero pueden implicar cualquier porción del tubo digestivo. Hay alrededor de 1 millón de personas diagnosticadas con IBD en los Estados Unidos sólo, diagnosticándose anualmente alrededor de 10.000 nuevos casos. Debido al efecto drástico en la calidad de vida de pacientes con IBD, se reclaman diez mil horas perdidas anualmente, que equivalen a mil millones de dólares en días de trabajo perdidos al año.

45

IBD produce un intervalo de síntomas gastrointestinales y extraintestinales, incluyendo diarrea, hemorragia rectal, dolor abdominal, pérdida de peso, trastornos de la piel y de los ojos, y crecimiento y maduración sexual retrasados en niños. Dos tipos de IBD son la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, que comparten síntomas y manifestaciones fisiológicas similares, pero difieren en la manera en que afectan al tubo digestivo. La colitis ulcerosa se caracteriza por inflamación ulcerosa de toda o parte de la mucosa colónica, muy frecuentemente incluyendo el recto. Sus síntomas incluyen hemorragia rectal y tenesmo rectal, tenesmo, y diarrea. La colitis ulcerosa está acompañada de complicaciones graves a corto y largo plazo. Las complicaciones más graves a corto plazo son colitis fulminante, megacolon tóxico, y perforación. Las complicaciones graves a largo plazo incluyen osteoporosis y cáncer colorrectal.

50

55

La enfermedad de Crohn es una inflamación transmural crónica, que puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, desde la boca hasta el ano. La enfermedad de Crohn es discontinua, con áreas no afectadas distribuidas a intervalos entre una o más áreas implicadas. Tarde en la enfermedad, la mucosa desarrolla un aspecto adoquinado, lo que resulta de ulceraciones longitudinales profundas entrelazadas con mucosa normal entremedia.

60

La mayoría de los pacientes con la enfermedad de Crohn presenta síntomas de dolor abdominal y dolor con la palpación, diarrea crónica o nocturna, hemorragia rectal, pérdida de peso, y fiebre. La enfermedad de Crohn

65

evoluciona con el tiempo desde una enfermedad principalmente inflamatoria hasta uno de dos patrones clínicos: compresivo (obstrutivo) o penetrante (fistulizante). En la forma compresiva, la inflamación transmural produce proliferación fibromuscular en la pared intestinal, seguido de estrechamiento luminal. Los síntomas de la obstrucción se hacen más habituales a medida que progresa la CD. En la forma penetrante, se forman fístulas como túneles de inflamación a través de la pared intestinal y rompen la superficie serosa, fistulizándose en tejidos contiguos e incluso a través de la piel.

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn se diagnostican generalmente usando criterios clínicos, endoscópicos, e histológicos. Sin embargo, hasta ahora las técnicas de diagnóstico tradicionales han establecido que ningún hallazgo individual es absolutamente de diagnóstico para una enfermedad u otra. Además, aproximadamente 20% de los pacientes tienen un cuadro clínico que cae entre la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se afirma que estos pacientes que se ajustan a este perfil tienen colitis indeterminada.

Los síntomas de IBD pueden impactar enormemente en el bienestar del paciente, la calidad de vida, y la capacidad para vivir. Los períodos inflamatorios son prolongados y frecuentes, y, dependiendo de la gravedad, discapacitantes. Debido a que la IBD es crónica y tiene típicamente un comienzo antes de los 30 años de edad, los pacientes requieren generalmente un tratamiento duradero. La elucidación del papel para nuevas proteínas y compuestos en estados mórbidos para la identificación de dianas potenciales y marcadores de diagnóstico es valiosa para mejorar el tratamiento actual de pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino.

SLE se caracteriza por la producción de auto-anticuerpos frente a una variedad de moléculas ubicuas, lo que puede tener consecuencias patógenas, incluyendo daño a numerosos órganos y tejidos, incluyendo piel, riñón, cerebro, y corazón. Los tratamientos aprobados actuales para SLE implican inmunosupresión no específica y el control de los síntomas mediante esteroides, fármacos inmunosupresores, inmunomoduladores, y fármacos antimaláricos. Sin embargo, estos enfoques de tratamiento dan como resultado riesgos de toxicidad renal y mortalidad prematura. De este modo, es deseable desarrollar un nuevo enfoque que interfiera específicamente con la activación de linfocitos y la producción de autoanticuerpos.

Otras enfermedades autoinmunitarias en las que la expresión incrementada de inmunoglobulina y/o células B desempeña un papel significativo incluyen trombocitopenia idiopática, artritis reumática (RA), anemia hemolítica autoinmunitaria, y miastenia grave. Las pruebas del papel de las células B y/o de la inmunoglobulina incrementada proceden de estudios con pacientes tratados con esteroides, agentes inmunosupresores, y/o anticuerpos anti-CD20 (que seleccionan como dianas a células B). La mejora en los síntomas en estas enfermedades se correlaciona con una disminución en las células B y/o en la inmunoglobulina sérica, subrayando el papel central que las células B desempeñan en una variedad de enfermedades autoinmunitarias.

La expresión incrementada de inmunoglobulina también se puede observar en enfermedades cancerígenas. Al igual que los trastornos autoinmunitarios, la etiología del cáncer es de origen similarmente multifuncional. El cáncer, que es la segunda causa principal de muerte en los Estados Unidos de América, se ha relacionado con mutaciones en el ADN, que causan un crecimiento sin restricción de las células. La predisposición genética desempeña un gran papel en el desarrollo de muchos cánceres, combinada con factores medioambientales, tales como tabaquismo y mutagénesis química.

El cáncer se puede producir en cualquier tejido u órgano del cuerpo. Los neoplasmas de células plasmáticas, incluyendo mieloma múltiple, mieloma "solitario" de hueso, plasmacitoma extramedular, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia (incluyendo macroglobulinemia de Waldenström), enfermedad de cadenas pesadas, amiloidosis primaria, gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS), están asociados con la expresión incrementada de inmunoglobulinas. La leucemia linfocítica crónica (CLL), un neoplasma no de células plasmáticas, también está asociado con niveles elevados de expresión de inmunoglobulina.

Los mielomas, o enfermedad de Kahler, son tumores de células plasmáticas derivados de un solo clon, que se originan típicamente en tejido linfoide secundario y migran después a, y residen en, tejido de médula ósea. Los mielomas afectan habitualmente a la médula ósea y a estructuras óseas adyacentes, con síntomas primarios de dolor óseo y fracturas o lesiones patológicas (lesiones óseas osteolíticas), hemorragia anormal, anemia, y susceptibilidad incrementada a infecciones. Las etapas avanzadas de la enfermedad incluyen insuficiencia renal, deformidades esqueléticas, compactación de la médula espinal, e hipercalcemia. El mieloma afecta a las células del hueso induciendo la resorción de osteoclastos del hueso, diezmando por tanto la estructura ósea e incrementando la concentración de calcio en el plasma. La etiología de los mielomas es actualmente desconocida. Se ha postulado una relación con daño por radiación, mutaciones en oncogenes, causas familiares, y expresión anormal de IL6.

Los mielomas múltiples son tumores de células plasmáticas con múltiples orígenes. Los mielomas múltiples dan cuenta de casi el 10% de todas las neoplasias de células plasmáticas, y son el cáncer de tumor de hueso más común en adultos, con una tasa de incidencia anual de 3 a 4 casos por 100.000 personas. En los Estados Unidos de América, los mielomas múltiples son la segunda neoplasia hematológica más habitual tras el linfoma no de Hodgkin, con aproximadamente 50.000 casos en los Estados Unidos de América sólo, y aproximadamente

13.500 nuevos casos dados a conocer cada año. El pronóstico para pacientes diagnosticados con mielomas múltiples es sombrío, con sólo varios meses a un año para pacientes con formas avanzadas de la enfermedad.

Las regiones de tratamientos tradicionales para mieloma y mielomas múltiples (en adelante denominados como "mieloma") consisten en quimioterapia, terapia de radiación, y cirugía. Además, se recomienda un trasplante de médula ósea para pacientes que de otro modo tienen buena salud. La tasa de curación para pacientes se aproxima al 30%, y es el único método conocido que puede curar mielomas. Sin embargo, para individuos ancianos y que no pueden tolerar procedimientos de trasplante de médula ósea, lo más apropiado es la quimioterapia.

Los procedimientos de diagnóstico actuales incluyen rayos X, aspiración de médula ósea, ensayos de sangre y orina (para detectar la presencia de la proteína de Bence Jones), y el ensayo de velocidad de sedimentación eritrocítica. También se han identificado marcadores potenciales de la superficie celular en células plasmáticas mielomatosas, incluyendo CD38, CD9, CD10, HLA-DR, y CD20. Ruiz-Aruggelles GJ y San Miguel JF, Cell Surface Markers in Multiple Myeloma, Mayo Clin. Proc. 69:684-90 (1994). Otros marcadores que no son de la estirpe celular B incluyen CD2, CD4, CD13, CD14, CD15, CD23, CD24, CD25, CD33, CD39, CDw40, CD41, CD45R, CD54, CD56 y CD71, así como antígenos no arracimados, R1-3, PCA-1, PCA-2, PC1, 62B1, 8A, 8F6 y MM4). Ruiz-Aruggelles, *más arriba*; Leo R, *et al.*, Multiparameter analysis of normal and malignant human plasma cells, Ann. Hematol. 64:132-9 (1992). Además, la aparición de anticuerpos anormales, conocidos como proteína M, es un indicador de mieloma múltiple. La producción incrementada de proteína M se ha relacionado con síndrome de hiperviscosidad en mielomas múltiples, que provoca efectos secundarios debilitantes, incluyendo fatiga, cefaleas, disnea, confusión mental, dolor torácico, daño e insuficiencia renal, problemas de visión, y fenómeno de Raynaud (mala circulación sanguínea, particularmente dedos de las manos, dedos de los pies, nariz y orejas). La crioglobulinemia se produce cuando la proteína M en la sangre forma partículas en condiciones frías. Estas partículas pueden bloquear pequeños vasos sanguíneos y provocar dolor y entumecimiento en los dedos de los pies, dedos de las manos, y otras extremidades durante el tiempo frío. También se han estudiado indicadores de pronóstico, tales como supresiones cromosómicas, niveles elevados de microglobulina beta-2, niveles de creatinina sérica e isotipado de IgA. Tricot G, *et al.*, Poor prognosis in Multiple Myeloma, Blood 86:4250-2 (1995).

CS1 (SLAMF7, 19A; Número de Acceso Genbank NM_021181.3, Ref. Boles y Mathew (2001) Immunogenetics 52:302-307; Bouchon *et al.*, (2001) J. Immunol. 167:5517-5521; Murphy *et al.*, (2002) Biochem. J. 361:431-436) es un miembro del subconjunto CD2 de la superfamilia de inmunoglobulinas. Las moléculas de la familia de CD2 están implicadas en un amplio intervalo de funciones inmunomoduladoras, tales como la coactivación, proliferación, diferenciación, y adhesión de linfocitos, así como secreción de inmunoglobulinas, producción de citocinas, y citotoxicidad de células NK. Varios miembros de la familia de CD2, tales como CD2, CD58, y CD150, desempeñan un papel, o se ha propuesto que desempeñan un papel, en un número de enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias, tales como psoriasis, artritis reumatoide, y esclerosis múltiple.

CS1 (también conocido como CRACC, 19A, APEX-1, y FOAP12) se aisló y clonó por Boles, K. *et al.* (véase Immunogenetics 52: 302-307 (2001)). Se ha dado a conocer que CS1 desempeña un papel en la citotoxicidad mediada por células NK, y en la adhesión linfocítica (Bouchon, A., *et al.*, J. of Immuno.5517-5521 (2001); Murphy, J. *et al.*, Biochem. J. 361: 431-436 (2002)).

La publicación PCT WO 01/46260 describe un anticuerpo monoclonal frente a APEX-1, y el uso del mismo para detectar el dominio extracelular recombinante producido de APEX-1. Sin embargo, no se han desarrollado ni descrito en las publicaciones citadas anteriormente anticuerpos capaces de inhibir la producción de inmunoglobulinas mediante células B y/o la proliferación y/o el desarrollo de mielomas. También, en las publicaciones citadas anteriormente no se han desarrollado o descrito pruebas de la sobreexpresión de CS-1 en enfermedad autoinmunitaria o cáncer.

Sumario de la invención

La elucidación de un papel para nuevas proteínas y compuestos en estados mórbidos para la identificación de dianas potenciales y marcadores de diagnóstico es valiosa para mejorar el tratamiento actual de pacientes con enfermedades autoinmunitarias y con cáncer, incluyendo pacientes que sufren IBD, SLE, RA y mieloma. En consecuencia, se describen aquí dianas moleculares para el tratamiento y diagnóstico de estas enfermedades, particularmente CS1. Adicionalmente, se proporcionan aquí antagonistas que se unen a, y neutralizan, CS1, incluyendo anticuerpos anti-CS1 neutralizantes.

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que no se detecta expresión significativa de la proteína CS1 en plaquetas, glóbulos rojos, células endoteliales (HuVEC), células renales, células de las vías respiratorias bronquiales, células pequeñas de las vías respiratorias, células de la próstata, hepatocitos o células de la mama. La expresión de CS1 es específica de linfoides, y se detecta en células procedentes de pacientes, incluyendo células plasmáticas procedentes de pacientes con mieloma múltiple y leucemia de células plasmáticas. La expresión se detecta sólo en células plasmáticas, y no es detectable en cantidades significativas en otros tipos de células procedentes de muestras de médula ósea. En consecuencia, la presente invención ha

demostrado la factibilidad de usar anticuerpos anti-CS1 como agentes terapéuticos para el tratamiento de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a, neoplasmas de células plasmáticas, incluyendo mieloma, mieloma múltiple, mieloma "solitario" de hueso, plasmacitoma extramedular, leucemia de células plasmáticas, macroglobulinemia (incluyendo macroglobulinemia de Waldenstrom), enfermedad de cadenas pesadas, amiloidosis primaria, gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS). Además, los neoplasmas no de células plasmáticas, asociados con la expresión incrementada de inmunoglobulina, incluyendo leucemia linfocítica crónica (CLL), también se beneficiarán de la terapia anti-CS1.

Además, estudios previos no han revelado la expresión de proteína CS1 en células B de sangre periférica activadas por PWM (mitógeno extraído de la raíz de la *Phytolacca americana*) *in vitro*, subconjuntos de linfocitos B y T de sangre periférica de memoria/efectores frente a los no sometidos a tratamiento previo, o monocitos/macrófagos CD14⁺ procedentes de sangre periférica. Estudios previos tampoco han revelado el papel de CS1 en la producción de inmunoglobulinas. Como resultado, no se ha establecido previamente la correlación entre CS1 y las enfermedades autoinmunitarias. La presente invención también se basa en parte en el descubrimiento de que el ARN de CS1 y la expresión proteica están fuertemente aumentados en células B de sangre periférica activadas, el subconjunto de células responsable de la producción de autoanticuerpos y que se cree que desempeñan un papel significativo en el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Además, se revela aquí que la expresión del ARN de CS1 en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con SLE está incrementada en comparación con células B procedentes de adultos sanos de la misma edad, así como en pacientes que sufren IBD. También se revela aquí que CS-1 es expresada en células plasmáticas infiltrantes en el sinovio con artritis reumatoide (RA). La presente invención también reveló que CS1 está implicada en la producción de anticuerpos, y que los anticuerpos dirigidos contra CS1 disminuyen IgM e IgG segregadas por células B procedentes de adultos sanos y pacientes con lupus. Subsiguientemente, los datos de la presente invención sugieren que CS1 desempeña un papel importante en el establecimiento de enfermedades autoinmunitarias, especialmente SLE, IBD, y RA. Otras enfermedades asociadas con un incremento en inmunoglobulina, células B, y/o productos de células B, también se beneficiarían del tratamiento anti-CS1, incluyendo la enfermedad de crioaglutinina, enfermedades inmunoampollosas (incluyendo penfigoide ampollosa, pénfigo, dermatitis herpetiforme, enfermedad de IgA lineal, y epidermólisis ampollosa adquirida), crioglobulinemia mixta, hipergammaglobulinemia, síndrome de Sjogren, anemia autoinmunitaria, asma, miastenia grave, esclerosis múltiple, inflamación miocárdica o pericárdica, dermatitis atópica, psoriasis, liquen mixedematoso, y enfermedad de Gaucher.

Además, no se han realizado estudios anteriormente para examinar la factibilidad de usar anticuerpos anti-CS1 para tratar enfermedades autoinmunitarias y cánceres de células plasmáticas, incluyendo mieloma y leucemia de células plasmáticas. Un anticuerpo terapéutico ideal se debería de unir principalmente a las células diana. La unión a otras células y tejidos podría provocar daño potencial a esas células y tejidos, y/o agotar el anticuerpo terapéutico de manera que es necesario suministrar al paciente una cantidad en exceso del anticuerpo para lograr la eficacia deseada del tratamiento. De forma más importante, un anticuerpo que se une a las plaquetas puede tener efectos secundarios, tales como activación plaquetaria (lo que puede conducir a una coagulación excesiva), o agotamiento plaquetario (lo que puede conducir al fallo de la coagulación sanguínea). Por lo tanto, habitualmente no es factible usar un anticuerpo como agente terapéutico si el anticuerpo se une a múltiples células y tejidos, especialmente si se une a las plaquetas. La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de que no se detecta expresión significativa de la proteína CS1 en plaquetas, glóbulos rojos, HuVEC, células renales, células de las vías respiratorias bronquiales, células pequeñas de las vías respiratorias, células de la próstata, hepatocitos y células de la mama. En consecuencia, la presente invención ha demostrado la factibilidad de usar anticuerpos anti-CS1 como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, y cánceres de células plasmáticas, incluyendo mieloma y leucemia de células plasmáticas.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID n°: 1, para su utilización en el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma. La presente invención se refiere asimismo a la utilización de un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID n°: 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma. La presente invención se refiere además a un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, ligado a un resto efector, y preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID n°: 1, para su utilización en el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma. La presente invención se refiere además a la utilización de un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista ligado a un resto efector, y preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID n°: 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma. Los anticuerpos neutralizan al menos una actividad biológica de CS1, en los que dichos anticuerpos se unen a CS1 y son capaces de por lo menos una de las actividades seleccionadas de entre el grupo que consiste en: (a) inhibir la secreción de inmunoglobulinas y/o la

5 producción mediante linfocitos, y (b) inducir la lisis de células que expresan CS1. El anticuerpo o fragmentos de anticuerpos de la presente divulgación comprenden una secuencia de aminoácidos que comparte al menos 85% de identidad con una cualquiera de las SEC ID NOS: 3-26. La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo, en el que dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo se une a sustancialmente el mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEC ID NOS: 3-26.

10 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 4.

15 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo o a un fragmento de anticuerpo, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 6.

20 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo o a su fragmento de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 7, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8.

25 La presente divulgación también se refiere a una región que determina la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NOS 9, 10, 11, 15, 16, 17, 21, 22, o 23.

30 La presente divulgación también se refiere a una región que determina la complementariedad (CDR) de la cadena ligera de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID NOS 12, 13, 14 18, 19, 20, 24, 25, o 26.

35 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo o a su fragmento que se une al antígeno, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 27, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 28.

40 La presente divulgación también se refiere a una región que determina la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 30. La presente divulgación se refiere asimismo a una región que determina la complementariedad (CDR) de un anticuerpo anti-CS1 descrito en la presente memoria.

45 La presente divulgación también se refiere a un anticuerpo humanizado o a su fragmento de unión al antígeno, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de la cadena pesada madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 41, y una región variable de la cadena ligera madura que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 44. La presente divulgación también se refiere a una región que determina la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de un anticuerpo humanizado que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 31.

50 La presente divulgación también se refiere a anticuerpos para la utilización en el tratamiento del mieloma que se unen a sustancialmente el mismo epítipo de un anticuerpo monoclonal producido mediante una estirpe celular de hibridoma Luc90 que tiene un número de acceso de ATCC PTA-5091, o que se une a un epítipo que no solapa de un anticuerpo monoclonal producido mediante una estirpe celular de hibridoma que tiene un número de acceso de ATCC PTA-5091.

55 La presente divulgación se refiere asimismo a anticuerpos que se unen a sustancialmente el mismo epítipo de un anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma Luc63, depositada con el ATCC el 6 de mayo de 2004, o que se une a un epítipo que no solapa de un anticuerpo monoclonal producido por la estirpe celular de hibridoma Luc63.

60 La presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo reivindicado y un vehículo farmacéutico.

Un método para reducir la secreción de inmunoglobulinas mediante linfocitos comprende poner en contacto los leucocitos o linfocitos con una cantidad efectiva de anticuerpo anti-CS1.

65 Un método para inducir citotoxicidad de células que expresan CS1 comprende poner en contacto dichas células con una cantidad efectiva de un anticuerpo contra CS1.

Pueden utilizarse los anticuerpos anti-CS1 o fragmentos de unión a antígeno anti-CS1 de la presente invención para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias, tales como SLE e IBD, y cáncer, tal como mieloma, en un sujeto que lo necesita, comprenden administrar a dicho sujeto una cantidad efectiva de un antagonista de CS1. Preferentemente, estos anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo de un anticuerpo monoclonal producido mediante una estirpe celular de hibridoma que tiene un número de acceso de ATCC PTA-5091, o que tiene la denominación Luc63.

Los métodos para determinar la presencia o ausencia de una célula patológica en un paciente asociada con enfermedades autoinmunitarias y cáncer comprenden detectar un ácido nucleico que comprende una secuencia al menos 80% idéntica, preferentemente 90% idéntica, más preferentemente 95% idéntica, a una secuencia como se describe en la Tabla 2, denominada en lo sucesivo como CS1, en una muestra biológica procedente del paciente, determinando de ese modo la presencia o ausencia de la célula patológica. La muestra biológica comprende ácidos nucleicos aislados, en la que los ácidos nucleicos pueden ser ARNm, ADN u otros ácidos nucleicos. La muestra biológica es tejido de un órgano que está afectado por la patología, incluyendo enfermedades autoinmunitarias, incluyendo SLE, RA, e IBD, y cáncer, tal como mieloma y leucemia de células plasmáticas. Una etapa posterior puede incorporar la amplificación de los ácidos nucleicos antes de la etapa de detección del ácido nucleico. La detección es de una proteína codificada por el ácido nucleico, comprendiendo el ácido nucleico una CS1. La etapa de detección se puede llevar a cabo usando una sonda de ácido nucleico marcada. La etapa de detección puede utilizar un biochip, que comprende una secuencia al menos 80% idéntica a una secuencia de CS1, preferentemente 90% idéntica, más preferentemente 95% idéntica, o que detecta un polipéptido codificado por el ácido nucleico. La muestra biológica puede derivar de un paciente que sufre un régimen terapéutico para tratar la patología, o se sospecha que tiene una enfermedad autoinmunitaria o patología cancerosa, incluyendo mieloma y leucemia de células plasmáticas.

También se describen composiciones, por ejemplo una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de CS1, incluyendo, por ejemplo, aquellas que están marcadas; un vector de expresión que comprende tal ácido nucleico; una célula hospedante que comprende tal vector de expresión; un péptido aislado que es codificado por tal molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de CS1; o un anticuerpo que se une específicamente al polipéptido. En formas de realización particulares, el anticuerpo está conjugado a un componente efector, está conjugado a un marcador detectable (incluyendo, por ejemplo, un marcador fluorescente, un radioisótopo, o un compuesto químico citotóxico), o es un anticuerpo humanizado.

Breve descripción de los dibujos

Tablas

La Tabla 1 proporciona los resultados que muestran actividades de unión específica de un panel de anticuerpos monoclonales anti-CS1.

La Tabla 2 proporciona el ácido nucleico y las secuencias de aminoácidos para CS-1.

La Tabla 3A y 3B muestran los resultados del tratamiento anti-CS1 en la reducción de la producción de IgG por linfocitos de células B activados in vitro.

La Tabla 4 proporciona las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID n°: 3) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID n°: 4) de Luc90; las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID n°: 5) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID n°: 6) de Luc63; y las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID n°: 7) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID n°: 8) de Luc34. Las SEC ID NOS: 9, 10 y 11 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc90. Las SEC ID NOS: 12, 13 y 14 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc90. Las SEC ID NOS: 15, 16 y 17 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc63. Las SEC ID NOS: 18, 19 y 20 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc63. Las SEC ID n°s: 21, 22 y 23 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena pesada de Luc34. Las SEC ID NOS: 24, 25 y 26 representan las secuencias de aminoácidos de las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de la cadena ligera de Luc34.

La Tabla 5 proporciona secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (SEC ID n°: 27) y de la región variable de la cadena ligera (SEC ID n°: 28) de Luc63. Las SEC ID NOS: 30-32 y las SEC ID NOS: 35-37 representan las CDR de la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera, respectivamente. La SEC ID n°: 33 representa la mutación de un solo aminoácido, de NYT a NYA (en cursiva), en CDR2 de la región variable de la cadena pesada de Luc63.

La Tabla 6 proporciona las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada de ratón de Luc63 (SEC ID n°: 38), del ADNc de la región variable de la cadena pesada de humano (SEC ID n°: 39), del ADNc de JH1 humano (SEC ID n°: 40), y de la región variable de la cadena pesada de Luc63 humanizada (SEC ID n°: 41). También se proporcionan secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera de ratón (SEC ID n°: 42), del ADNc de la región variable de la cadena ligera de humano (SEC ID n°: 43), y de la región variable de la cadena ligera de Luc63 humanizada (SEC ID n°: 44).

La Tabla 7 proporciona un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones VH. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VH de MuLuc63 y HuLuc63 (SEC ID n°s: 45 y 47, respectivamente), y los fragmentos E55 3-14 y JH1 de ADNc humano (SEC ID n°: 46) se muestran en el código de una sola letra. Las secuencias de las CDR basadas en la definición de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), están subrayadas en la secuencia de VH de MuLuc63; la numeración también está de acuerdo con Kabat. Las secuencias de las CDR en el segmento VH humano se omiten en la figura. Se predice que los aminoácidos subrayados individuales en la secuencia VH de HuLuc63 entran en contacto con las secuencias de CDR, y por lo tanto se sustituyeron con los restos de ratón correspondientes. La mutación de treonina (T) a alanina (A), realizada en CDR2 para eliminar el sitio de glucosilación enlazado a N (NYT) potencial, se indica con un doble subrayado.

La Tabla 8 proporciona un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las regiones VL. Las secuencias de aminoácidos de las regiones VL de MuLuc63 y HuLuc63 (SEC ID n°s: 48 y 50, respectivamente), y la secuencia de ADNc III-2R humano (SEC ID n°: 49) se muestran en el código de una sola letra. Las secuencias de las CDR basadas en la definición de Kabat (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª ed., National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)), están subrayadas en la secuencia de VL de MuLuc63; la numeración también está de acuerdo con Kabat. Las secuencias de las CDR en el segmento VL humano se omiten en la figura. Se predice que los aminoácidos subrayados individuales en la secuencia VL de HuLuc63 entran en contacto con las secuencias de CDR, y por lo tanto se sustituyeron con el resto de ratón correspondiente.

La Tabla 9 enumera los oligonucleótidos usados para la clonación de los genes de VH y de VL de HuLuc63.

Figuras

La Figura 1A muestra la expresión de CS1 predominantemente en células B plasmáticas y de memoria.

La Figura 1B muestra la expresión de CS1 en muestras de tejido de riñón, de corazón, de ganglio linfático, de hígado, de intestino delgado, de cerebro, de médula espinal, de músculo esquelético, de bazo y de pulmón.

La Figura 2A muestra la expresión de CS1 en leucocitos y otros tejidos adultos normales.

La Figura 2B muestra la expresión incrementada de CS1 en múltiples poblaciones de leucocitos activados.

La Figura 3 muestra los resultados de ensayos de competición de anticuerpos monoclonales anti-CS1.

La Figura 4 muestra la afinidad relativa de anticuerpos monoclonales anti-CS1.

La Figura 5A muestra la tinción inmunohistológica de células que expresan CS1 con tres de los anticuerpos monoclonales anti-CS1 (Luc 23, Luc 38, y Luc 63).

La Figura 5B muestra la tinción inmunohistológica de amígdala inflamada con anticuerpos monoclonales anti-CS1 y anti-CD138.

La Figura 5C muestra la tinción inmunohistológica del tejido articular sinovial procedente de un paciente con artritis reumatoide con anticuerpos monoclonales anti-CS1 y anti-CD138.

La Figura 6 muestra la tinción de la superficie celular de células mononucleares de sangre periférica tratadas con mitógeno extraído de la raíz de la *Phytolacca americana* frente a células mononucleares de sangre periférica no estimuladas, con tres de los anticuerpos monoclonales anti-CS1 (Luc 63, Luc34 y Luc 38).

La Figura 7 muestra la actividad de unión de Luc 63 humanizada (NYT de tipo salvaje frente a la mutación NYA desglucosilada) en ensayos de unión a CS1 a base de ELISA.

La Figura 8 muestra un modelo tridimensional de la región variable de Luc 63 humanizada.

La Figura 9 muestra el aumento de la expresión de CS1 en linfocitos B y T de sangre periférica activados, ensayados mediante análisis de PCR en tiempo real.

La Figura 10 muestra la expresión incrementada de CS1 en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con SLE, comparada con adultos sanos de edad parecida, estudiada mediante análisis de PCR en tiempo real.

5 La Figura 11 muestra una representación gráfica de la expresión de CS-1 en comparación con células epiteliales colónicas adultas normales en experimentos de microchips: la expresión de CS-1 está incrementada en pacientes con colitis ulcerosa (n = 4) y enfermedad de Crohn (n = 5) en comparación con células epiteliales colónicas adultas normales. Los números sobre los símbolos de las barras indican las veces de cambio con respecto a células epiteliales colónicas adultas normales para cada muestra.

10 La Figura 12 muestra el aumento de la expresión de CS1 en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino con cuantificación mediante PCR en tiempo real. La expresión de CS-1 está incrementada en pacientes con colitis ulcerosa (n = 2) y con enfermedad de Crohn (n = 3) en comparación con muestras reunidas de tejido de intestino grueso adulto normal. Los números sobre los símbolos de las barras indican las veces de cambio con respecto al tejido del intestino grueso adulto normal para cada muestra.

La Figura 13 muestra la expresión notable de CS1 en células de mieloma.

20 La Figura 14A-14H muestra la expresión de CS1 en células plasmáticas de médula ósea procedentes de pacientes con mieloma múltiple.

La Figura 14I muestra la expresión de CS1 en células de sangre periférica procedentes de un paciente con leucemia de células plasmáticas.

25 La Figura 15 muestra la expresión de CS1 en subtipos de células de médula ósea.

La Figura 16 muestra la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1, de la secreción de IgM in vitro de las PBMC activadas.

30 La Figura 17 muestra la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1, en comparación con anticuerpos monoclonales anti-CD2, de la secreción de IgM in vitro de linfocitos.

La Figura 18 muestra la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1, de la secreción de IgG in vitro de linfocitos de pacientes sanos adultos y con enfermedades autoinmunitarias.

35 La Figura 19A muestra la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1, de la producción de IgG humana in vivo en el modelo de ratón SCID-HuPBMC.

40 La Figura 19B muestra una comparación de la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1 Luc 90 y 63, de la producción de IgG humana in vivo en el modelo de ratón SCID-HuPBMC.

La Figura 19C muestra un resumen de la inhibición, mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1, de la producción de IgG humana in vivo en un modelo de ratón SCID-HuPBMC.

45 La Figura 20 muestra la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1 Luc90 y Luc63.

50 La Figura 21A muestra la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediante anticuerpos monoclonales Luc90 quiméricos anti-CS1, que está potenciada por anticuerpos quiméricos con niveles reducidos de fucosa.

La Figura 21B muestra la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células OPM2 de mieloma múltiple mediante anticuerpos monoclonales Luc90 quiméricos anti-CS1.

55 La Figura 21C muestra la inducción de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células L363 de mieloma múltiple mediante anticuerpos monoclonales Luc90 quiméricos anti-CS1.

La Figura 22 muestra volúmenes tumorales reducidos en modelos de xenoinjerto de ratón de mieloma múltiple tratados con anticuerpos anti-CS1 Luc 90 y Luc 63 frente a anticuerpos de control de isotipo.

60 **Descripción detallada de la invención**

Según los objetos esquematizados anteriormente, se describen aquí nuevos métodos para el tratamiento de diversos trastornos, por ejemplo trastornos autoinmunitarios y diversas patologías cancerosas definidas, incluyendo diversas formas de mieloma. También se describen métodos para la evaluación de diagnóstico y de pronóstico de tales trastornos, así como métodos para identificar composiciones que modulen tales afecciones.

También se describen aquí métodos para monitorizar la eficacia terapéutica de tal tratamiento, incluyendo la monitorización e identificación de marcadores expresados selectivamente en dichos trastornos.

En particular, la identificación de marcadores expresados selectivamente en trastornos autoinmunitarios, tales como SLE, RA, e IBD, y afecciones cancerosas, tales como mieloma y leucemia de células plasmáticas, permite el uso de esa expresión en métodos de diagnóstico, de pronóstico, o terapéuticos. Como tal, la invención define diversas composiciones, por ejemplo polipéptidos y anticuerpos que serán útiles para identificar selectivamente esos marcadores. Los marcadores pueden ser útiles para la caracterización molecular de subconjuntos de las enfermedades, subconjuntos los cuales pueden requerir realmente tratamientos muy diferentes. Además, los marcadores pueden ser también importantes en enfermedades relacionadas con trastornos autoinmunitarios, mieloma, leucemia de células plasmáticas, por ejemplo, que afectan a tejidos similares como en tales afecciones, o tienen mecanismos similares de inducción/mantenimiento. Por ejemplo, también se pueden seleccionar como dianas procesos o características tumorales. Están disponibles los usos de diagnóstico y de pronóstico, por ejemplo para subclasificar enfermedades relacionadas pero distintas, para diferenciar etapas de trastornos autoinmunitarios como mieloma o leucemia de células plasmáticas, o para determinar la estrategia de tratamiento de tales afecciones. Los métodos de detección se pueden basar en ácido nucleico, por ejemplo mediante técnicas de hibridación o de PCR, para proteína, por ejemplo ELISA, formación de imágenes, IHC, etc. El diagnóstico puede ser cualitativo o cuantitativo, y puede detectar incrementos o reducciones en los niveles de expresión.

Definiciones

La expresión “proteína CS1” o “polinucleótido CS1” o “transcrito asociado a CS1” se refiere a variantes polimórficas, alelos, mutantes, y homólogos de interespecies de ácido nucleico o de polipéptido que: (1) tienen una secuencia nucleotídica que tiene una identidad de secuencia nucleotídica mayor que alrededor de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, preferentemente una identidad de secuencia nucleotídica de alrededor de 92%, 94%, 96%, 97%, 98%, o 99% o mayor, preferentemente a lo largo de una región de al menos alrededor de 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más nucleótidos, con una secuencia nucleotídica de o asociada con el gen de CS1 (Tabla 2), la unión del gen de CS1 (Tabla 2) a parejas de unión, por ejemplo anticuerpos policlonales, provocados frente a un inmunógeno que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica de o asociada con el gen de CS1 (Tabla 2), y sus variantes modificadas de forma conservativa; (3) se hibridan específicamente en condiciones de hibridación restrictivas a una secuencia de ácido nucleico, o al complemento de la misma de CS1 (Tabla 2) y sus variantes modificadas de forma conservativa; o (4) tienen una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos mayor que alrededor de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, preferentemente una identidad de secuencia de aminoácidos de 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, o 99% o mayor, preferentemente a lo largo de una región de al menos alrededor de 25, 50, 100, 200, 500, 1000, o más aminoácidos, con una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia nucleotídica de o asociada con el gen de CS1 (Tabla 2). Una secuencia polinucleotídica o polipeptídica típicamente procede de un mamífero, incluyendo, pero sin limitarse a, primate, por ejemplo ser humano; roedor, por ejemplo rata, ratón, hámster; vaca, cerdo, caballo, oveja, u otro mamífero. Un “polipéptido CS1” y un “polinucleótido CS1” incluyen formas tanto de origen natural como recombinantes.

Una proteína o ácido nucleico CS1 “de longitud completa” se refiere a una secuencia polipeptídica o polinucleotídica CS1, o una variante de la misma, que contiene elementos contenidos normalmente en una o más secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas CS1 de tipo salvaje, de origen natural. La “longitud completa” puede ser antes de, o después de, diversas etapas de procesamiento o de corte y empalme post-traduccional, incluyendo corte y empalme alternativo.

“Muestra biológica”, como se usa aquí, es una muestra de tejido o fluido biológico que contiene ácidos nucleicos o polipéptidos, por ejemplo de una proteína, polinucleótido, o transcrito de CS1. Tales muestras incluyen, pero no se limitan a, tejido aislado de primates, por ejemplo seres humanos, o roedores, por ejemplo ratones y ratas. Las muestras biológicas también pueden incluir secciones de tejidos tales como muestras de biopsia y de autopsia, secciones congeladas tomadas con fines histológicos, muestras de archivo, sangre, plasma, suero, esputo, heces, lágrimas, moco, pelo, piel, etc. Las muestras biológicas también incluyen explantes y cultivos celulares primarios y/o transformados derivados de tejidos de pacientes. Una muestra biológica se obtiene típicamente de un organismo eucariota, muy preferentemente un mamífero tal como un primate, por ejemplo chimpancé o ser humano; vaca; perro; gato; un roedor, por ejemplo cobaya, rata, ratón; conejo; o un pájaro; reptil; o pez. Son de interés los animales domésticos y de ganado.

“Proporcionando una muestra biológica” significa obtener una muestra biológica para uso en métodos descritos aquí. Muy a menudo, esto se realizará retirando una muestra de células de un animal, pero también se puede lograr usando células aisladas previamente (por ejemplo, aisladas por otra persona, en otro momento, y/o para otro fin), o llevando a cabo los métodos de la invención in vivo. Serán particularmente útiles los tejidos o materiales de archivo, que tienen historia de tratamiento o desenlace clínico.

Los términos “idéntico” o porcentaje de “identidad”, en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias

polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son las mismas o tienen un porcentaje específico de restos de aminoácidos o de nucleótidos que son iguales (por ejemplo, alrededor de 70% de identidad, preferentemente 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 93%, 95%, 97%, 98%, 99%, o mayor, de identidad a lo largo de una región específica, cuando se comparan y alinean en busca de la correspondencia máxima a lo largo de una ventana de comparación o región designada) según se mide usando, por ejemplo, algoritmos de comparación de secuencias BLAST o BLAST 2.0 con parámetros por defecto descritos más abajo, o mediante alineamiento manual e inspección visual. Se afirma entonces que tales secuencias son “sustancialmente idénticas”. Esta definición también se refiere al, o se puede aplicar al, el complemento de una secuencia de ensayo. La definición también incluye secuencias que tienen supresiones y/o inserciones, sustituciones, y variantes de origen natural, por ejemplo variantes polimórficas o alélicas, y variantes hechas por el hombre. Como se describe más abajo, los algoritmos preferidos pueden dar cuenta de saltos y similares. Preferentemente, la identidad existe a lo largo de una región que tiene al menos una longitud de alrededor de 25 aminoácidos o nucleótidos, o más preferentemente a lo largo de una región que tiene una longitud de alrededor de 50-100 aminoácidos o nucleótidos.

Para comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como secuencia de referencia, con la que se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan parámetros del programa de algoritmo de secuencias. Preferentemente, se pueden usar parámetros del programa por defecto, o se pueden designar parámetros alternativos. El algoritmo de comparación de secuencias calcula entonces el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa.

Una “ventana de comparación”, como se usa aquí, incluye referencia a un segmento de posiciones contiguas seleccionado del grupo que consiste típicamente de alrededor de 200 a 600, habitualmente alrededor de 50 a 200, más habitualmente alrededor de 100 a 150, en el cual se puede comparar una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que las dos secuencias estén alineadas de forma óptima. Los métodos de alineamiento de secuencias para comparación son bien conocidos. El alineamiento óptimo de las secuencias para comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482-489, mediante el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443-453, mediante el método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (1988) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, mediante implementaciones computerizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), o mediante alineamiento manual e inspección visual (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al.* (eds. 1995 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley).

Los ejemplos preferidos de algoritmos que son adecuados para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y similitud de secuencia incluye los algoritmos BLAST y BLAST 2.0, que se describen en Altschul, *et al.* (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402 y Altschul, *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. BLAST y BLAST 2.0 se usan, con los parámetros descritos aquí, para determinar el porcentaje de identidad de secuencia para las proteínas de la invención. El software para llevar a cabo los análisis de BLAST está disponible al público a través del National Center for Biotechnology Information. Este algoritmo implica en primer lugar identificar pares de secuencias de puntuación elevada (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de búsqueda, que coincide o satisface alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinea con una palabra de la misma longitud en una secuencia de una base de datos. T se denomina como el umbral de puntuación de palabra de vecindad (Altschul, *et al.*, más arriba). Estos resultados de palabra de vecindad iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largos que los contienen. Estos resultados de palabras se extienden en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia tanto como se pueda incrementar la puntuación de alineamiento acumulativa. Las puntuaciones acumulativas se calculan usando, por ejemplo, para secuencias nucleotídicas, los parámetros M (puntuación de recompensa para un par de restos coincidentes; siempre > 0) y N (puntuación de penalización para restos no coincidentes; siempre < 0). Para secuencia de aminoácidos, se usa una matriz de puntuación para calcular la puntuación acumulativa. La extensión de los resultados de las palabras en cada dirección se detienen cuando: la puntuación del alineamiento acumulativa cae fuera de la cantidad X desde su valor logrado máximo; la puntuación acumulativa llega a cero o debajo de cero, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos que puntúan de forma negativa; o se alcanza el final de cada secuencia. Los parámetros W , T y X del algoritmo de BLAST determinan la sensibilidad y velocidad del alineamiento. El programa BLASTN (para secuencias nucleotídicas) usa como defectos una longitud de palabra (W) de 11, una expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas hebras. Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa como defectos una longitud de palabra de 3, una expectativa (E) de 10, y la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff (1992) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:10915-919), alineamientos (B) de 50, expectativa (E) de 10, $M = 5$, $N = -4$, y una comparación de ambas hebras.

El algoritmo de BLAST también lleva a cabo un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias. Véase,

por ejemplo, Karlin y Altschul (1993) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90:5873-5787. Una medida de la similitud proporcionada por el algoritmo de BLAST es la probabilidad de la suma más pequeña ($P(N)$), que proporciona una indicación de la probabilidad mediante la cual se produciría por azar un emparejamiento entre dos secuencias nucleotídicas o de aminoácidos. Por ejemplo, un ácido nucleico se considera similar a una secuencia de referencia si la probabilidad de la suma más pequeña en una comparación del ácido nucleico de ensayo con el ácido nucleico de referencia es menor que alrededor de 0,2, más preferentemente menor que alrededor de 0,01, y lo más preferible menor que alrededor de 0,001. Los valores logarítmicos pueden ser grandes números negativos, por ejemplo 5, 10, 20, 30, 40, 40, 70, 90, 110, 150, 170, etc.

5 Una indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que el polipéptido codificado por el primer ácido nucleico reacciona inmunológicamente de forma cruzada con los anticuerpos provocados frente al polipéptido codificado por el segundo ácido nucleico. De este modo, un polipéptido es típicamente idéntico de forma sustancial a un segundo polipéptido, por ejemplo, cuando los dos péptidos difieren sólo en sustituciones conservativas. Otra indicación de que dos secuencias de ácido nucleico son sustancialmente idénticas es que las dos moléculas o sus complementos se hibridan entre sí en condiciones restrictivas. Aún otra indicación de que dos secuencias de ácidos nucleicos son sustancialmente idénticas es que se pueden usar los mismos cebadores para amplificar las secuencias.

10 Una "célula hospedante" es una célula de origen natural o una célula transformada que contiene un vector de expresión y apoya la replicación o expresión del vector de expresión. Las células hospedantes pueden ser células cultivadas, explantes, células in vivo, y similares. Las células hospedantes pueden ser células procariontas tales como *E. coli*, o células eucariotas, tales como células de levadura, de insectos, de anfibios, o de mamíferos, tales como CHO, HeLa, y similares (véase, por ejemplo, el catálogo o el sitio web de la American Type Culture Collection).

15 Los términos "aislado", "purificado", o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancial o esencialmente libre de componentes que normalmente lo acompañan según se encuentra en su estado nativo. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente usando técnicas de química analítica tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía de líquidos de altas prestaciones. Una proteína o ácido nucleico que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificado. En particular, un ácido nucleico aislado se separa de algunos marcos de lectura abiertos que flanquean de forma natural el gen y codifican proteínas distintas de la proteína codificada por el gen. El término "purificada", en algunas formas de realización, significa que una proteína da lugar a esencialmente una banda en un gel electroforético. Preferentemente, significa que la proteína es al menos alrededor de 85% pura, más preferentemente al menos 95% pura, y lo más preferible al menos 99% pura. "Purificar" o "purificación", en otras formas de realización, significa eliminar al menos un contaminante o componente de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no necesita que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo 100% puro.

20 Los términos "polipéptido", "péptido", y "proteína" se usan aquí de forma intercambiable para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural, conteniendo ellos restos modificados, y polímeros de aminoácidos de origen no natural.

25 El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son aquellos codificados mediante el código genético, así como aquellos aminoácidos que se modifican más tarde, por ejemplo hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, y O-fosfoserina. Los análogos de aminoácidos se refieren a compuestos que tienen la misma estructura química básica que el aminoácido de origen natural, por ejemplo un carbono que está unido a un hidrógeno, un grupo carboxilo, un grupo amino, y un grupo R, por ejemplo homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metilsulfonio. Tales análogos pueden tener grupos R modificados (por ejemplo, norleucina) o cadenas principales peptídicas modificadas, pero retienen cierta estructura química básica como el aminoácido de origen natural. El mimético de aminoácidos se refiere a un compuesto químico que tiene una estructura que es diferente de la estructura química general de un aminoácido, pero que funciona de forma similar a otro aminoácido.

30 Los aminoácidos se pueden referir aquí mediante sus símbolos de tres letras conocidos habitualmente, o mediante los símbolos de una letra recomendados por la IUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commission. Igualmente, los nucleótidos se pueden referir mediante sus códigos de una sola letra aceptados habitualmente.

35 "Variante modificada de forma conservativa" se aplica tanto a secuencias de aminoácidos como a secuencias de ácidos nucleicos. Con respecto a secuencias de ácidos nucleicos particulares, las variantes modificadas de forma conservativa se refieren a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o, cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas o asociadas, por ejemplo naturalmente contiguas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican la mayoría de las proteínas. Por

ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG, y GCU codifican cada uno el aminoácido alanina. De este modo, en cada posición en la que una alanina es especificada por un codón, el codón se puede alterar por otro de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservativa. Cada secuencia de ácido nucleico aquí que codifica un polipéptido también describe variaciones silenciosas del ácido nucleico. En ciertos contextos, cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es normalmente el único codón para metionina, y TGG, que es normalmente el único codón para triptófano) se pueden modificar para producir una molécula funcionalmente similar. En consecuencia, una variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en una secuencia descrita con respecto al producto de expresión, pero no necesariamente con respecto a las secuencias de las sondas reales.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, un experto reconocerá que las sustituciones, supresiones o adiciones individuales a una secuencia de ácido nucleico, peptídica, polipeptídica, o proteica que alteran, añaden, o suprimen un único aminoácido o un porcentaje pequeño de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservativa", en la que la alteración da como resultado la sustitución de un aminoácido por un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas. Tales variantes modificadas de forma conservativa son, además de, y sin excluir, variantes polimórficas, homólogos de interespecies, y alelos de la invención. Las sustituciones típicamente conservativas incluyen entre sí: 1) alanina (A), glicina (G); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); 6) fenilalanina (F), tirosina (I), triptófano (W); 7) serina (S), treonina (T); y 8) cisteína (C), metionina (M) (véase, por ejemplo, Creighton (1984) *Proteins: Structure and Molecular Properties* Freeman).

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

"Ácido nucleico" u "oligonucleótido" o "polinucleótido", o equivalentes gramaticales usados aquí, significa al menos dos nucleótidos enlazados covalentemente entre sí. Los oligonucleótidos tienen una longitud típicamente de alrededor de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 25, 30, 40, 50 o más, hasta alrededor de 100 nucleótidos de longitud. Los ácidos nucleicos y polinucleótidos son polímeros de cualquier longitud, incluyendo longitudes más largas, por ejemplo 200, 300, 500, 1000, 2000, 3000, 5000, 7000, 10.000, etc. Un ácido nucleico contendrá generalmente enlaces de fosfodiéster, aunque, en algunos casos, se incluyen análogos de ácidos nucleicos que pueden tener al menos un enlace diferente, por ejemplo enlaces de fosforamido, fosforotioato, fosforoditioato, u O-metilfosforoamido (véase Eckstein (1992) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* Oxford Univ. Press); y cadenas principales de enlaces de ácidos nucleicos peptídicos. Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas; cadenas principales no iónicas, y cadenas principales sin ribosa, incluyendo aquellas descritas en las patentes U.S. n^{os} 5.235.03 y 5.034.506, y los Capítulos 6 y 7 de Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research* ACS Symposium Series 580. También están incluidos dentro de una definición de ácidos nucleicos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos. Las modificaciones de la cadena principal de fosfato de ribosa se pueden realizar por una variedad de razones, por ejemplo para incrementar la estabilidad y vida media de tales moléculas en entornos fisiológicos, o como sondas en un biochip. Se pueden obtener mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural; como alternativa, se pueden obtener mezclas de diferentes análogos de ácidos nucleicos, y mezclas de ácidos nucleicos y análogos de origen natural.

Una variedad de referencias describen tales análogos de ácidos nucleicos, incluyendo, por ejemplo, enlaces de fosforamido (Beaucage, *et al.*, (1993) *Tetrahedron* 49:1925-1963 y referencias allí; Letsinger (1970) *J. Org. Chem.* 35:3800-3803; Sprinzi, *et al.* (1977) *Bur. J. Biochem.* 81:579-589; Letsinger, *et al.* (1986) *Nucl. Acids Res.* 14:3487-499; Sawai, *et al.* (1984) *Chem. Lett.* 805; Letsinger, *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470-4471; y Pauwels, *et al.* (1986) *Chemica Scripta* 26:141-149), de fosforotioato (Mag, *et al.* (1991) *Nucleic Acids Res.* 19:1437-441; y la patente U.S. n^o 5.644.048), de fosforoditioato (Brill, *et al.* (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:2321-2322), de O-metilfosforoamido (véase Eckstein (1992) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, Oxford Univ. Press), y cadenas principales y enlaces de ácidos nucleicos peptídicos (véanse Egholm (1992) *J. Am. Chem. Soc.* 114:1895-1897; Meier, *et al.* (1992) *Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1008-1010; Nielsen (1993) *Nature* 365:566-568; Carlsson, *et al.* (1996) *Nature* 380:207). Otros ácidos nucleicos análogos incluyen aquellos con cadenas principales positivas (Denpcy, *et al.* (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:6097-101; cadenas principales

no iónicas (patentes U.S. n^{os} 5.386.023, 5.637.684, 5.602.240, 5.216.141, y 4.469.863; Kiedrowski, *et al.* (1991) *Angew. Chem. Intl. Ed. English* 30:423-426; Letsinger, *et al.* (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110:4470-4471; Letsinger, *et al.* (1994) *Nucleoside and Nucleotide* 13:1597; Capítulos 2 y 3 en Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research ACS Symposium Series 580*; Mesmaeker, *et al.* (1994) *Bioorganic and Medicinal Chem. Lett.* 4:395-398; Jeffs, *et al.* (1994) *J. Biomolecular NMR* 34:17; Horn, *et al.* (1996) *Tetrahedron Lett.* 37:743) y cadenas principales sin ribosa, incluyendo aquellas descritas en las patentes U.S. 5.235.033 y 5.034.506, y Capítulos 6 y 7 en Sanghvi y Cook (eds. 1994) *Carbohydrate Modifications in Antisense Research ACS Symposium Series 580*. También se incluyen dentro de la definición de ácidos nucleicos los ácidos nucleicos que contienen uno o más azúcares carbocíclicos (véase Jenkins, *et al.* (1995) *Chem. Soc. Rev.* p 169-176). En Rawls (página 35, 2 de junio de 1997) *C&E News*, se describen varios análogos de ácidos nucleicos.

Se prefieren particularmente ácidos nucleicos peptídicos (PNA) que incluyen análogos de ácidos nucleicos peptídicos. Los ácidos nucleicos peptídicos tienen cadenas principales formadas por unidades de N-(2-aminoetil)-glicina que se repiten, enlazadas mediante enlaces peptídicos. Las diferentes bases (purinas y pirimidinas) están enlazadas a la cadena principal mediante enlaces metilencarbonílicos. Estas cadenas principales son sustancialmente no iónicas en condiciones neutras, en contraste con la cadena principal de fosfodiéster altamente cargada de los ácidos nucleicos de origen natural. Esto da como resultado al menos dos ventajas. La cadena principal de los PNA muestra una cinética de hibridación mejorada, dando como resultado una unión más fuerte entre las hebras de PNA/ADN que entre las hebras de PNA y las hebras de ADN. Los PNA tienen mayores cargas en la temperatura de fusión (T_m) para pares de bases desemparejadas frente a las perfectamente emparejadas. El ADN y el ARN muestran típicamente una caída de 2-4°C en T_m para un desemparejamiento interno. Con la cadena principal de los PNA no iónica, la caída está próxima a 7-9°C. De forma similar, debido a su naturaleza no iónica, la hibridación de las bases unidas a estas cadenas principales es relativamente insensible a la concentración de sal. Además, los PNA no se degradan por enzimas celulares, y de este modo pueden ser más estables.

Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios, según se especifique, y pueden contener porciones tanto de secuencia bicatenaria como monocatenaria. La representación de una única hebra también define la secuencia de la hebra complementaria; de este modo, las secuencias descritas aquí también proporcionan el complemento de la secuencia. El ácido nucleico puede ser ADN, tanto genómico como ADNc, ARN, o un híbrido, en el que el ácido nucleico puede contener combinaciones de desoxirribosa, y ribonucleótidos, y combinaciones de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xantina, hipoxantina, isocitosina, isoguanina, etc. "Transcrito" se refiere típicamente a un ARN de origen natural, por ejemplo un pre-ARNm, hnRNA, o ARNm. Como se usa aquí, el término "nucleósido" incluye nucleótidos y análogos nucleosídicos y nucleotídicos, y nucleósidos modificados tales como nucleósidos modificados con amino. Además, "nucleósido" incluye estructuras análogas de origen no natural. De este modo, por ejemplo, las unidades individuales de un ácido nucleico peptídico, que contienen cada una una base, se denominan aquí como un nucleósido.

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

Un "efector" o "resto efector" o "componente efector" es una molécula que está unida (o enlazada, o conjugada), ya sea covalentemente, a través de un ligador o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos, o de hidrógeno, a un anticuerpo. El "efector" puede ser una variedad de moléculas, incluyendo, por ejemplo, restos de detección que incluyen compuestos radioactivos, compuestos fluorescentes, enzimas o sustratos, etiquetas tales como etiquetas epitópicas, toxinas; restos activables, agentes quimioterapéuticos; lipasas; antibióticos; restos quimiotácticos, inmunomoduladores (micA/B), o radioisótopos, por ejemplo que emiten radiación beta "dura".

Una "sonda u oligonucleótido de ácido nucleico marcado" es aquel que está unido, por ejemplo covalentemente, a través de un ligador o un enlace químico, o no covalentemente, a través de enlaces iónicos, de van der Waals, electrostáticos, o de hidrógeno, a un marcador, de manera que la presencia de las sondas se puede detectar detectando la presencia del marcador unido a la sonda. Como alternativa, los métodos que usan interacciones de actividad elevada pueden lograr los mismos resultados, en los que uno de un par de parejas de unión se une al

otro, por ejemplo biotina, estreptavidina.

Como se usa aquí, una “sonda de ácido nucleico u oligonucleótido” es un ácido nucleico capaz de unirse a un ácido nucleico diana de secuencia complementaria a través de uno o más tipos de enlaces químicos, habitualmente a través de emparejamiento de bases complementarias, por ejemplo a través de la formación de enlaces de hidrógeno. Como se usa aquí, una sonda puede incluir bases naturales (por ejemplo, A, G, C, o T) o modificadas (7-desazaguanosina, inosina, etc.). Además, las bases en una sonda se pueden unir mediante un enlace distinto de un enlace de fosfodiéster, preferentemente aquel que no interfiera funcionalmente con la hibridación. De este modo, por ejemplo, las sondas pueden ser ácidos nucleicos peptídicos en los que las bases constituyentes se unen mediante enlaces peptídicos en lugar de mediante uniones de fosfodiéster. Las sondas se pueden unir a secuencias diana que carecen de complementariedad completa con la secuencia de la sonda, dependiendo de la restricción de las condiciones de hibridación. Las sondas están marcadas preferentemente de forma directa, por ejemplo con isótopos, cromóforos, lumíforos, cromógenos, o marcadas indirectamente, por ejemplo con biotina, a la que se puede unir más tarde un complejo de estreptavidina. Evaluando la presencia o ausencia de la sonda, se puede detectar la presencia o ausencia de la secuencia o subsecuencia seleccionada. El diagnóstico o pronóstico se puede basar a nivel genómico, o a nivel de la expresión proteica o ARN.

El término “recombinante”, cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína, o vector, se ha modificado mediante la introducción de un ácido nucleico o proteína heterólogo, o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativo, o que la célula deriva de una célula así modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula, o expresan genes nativos que de otro modo son expresados anormalmente, son subexpresados, o no son expresados en absoluto. Mediante la expresión “ácido nucleico recombinante” se quiere decir aquí ácido nucleico, originalmente formado in vitro, en general, mediante la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, usando polimerasas y endonucleasas, en una forma que no se encuentra normalmente en la naturaleza. De esta manera, se logra el enlace de forma operable de las diferentes secuencias. Así, un ácido nucleico aislado, en forma lineal, o un vector de expresión formado in vitro ligando moléculas de ADN que no se unen normalmente, se consideran ambos recombinantes para los fines de esta invención. Se entiende que una vez que se obtiene un ácido nucleico recombinante y se reintroduce en una célula hospedante u organismo, se replicará de forma no recombinante, por ejemplo usando la maquinaria celular in vivo de la célula hospedante, en lugar de manipulaciones in vitro; sin embargo, tales ácidos nucleicos, una vez producidos recombinantemente, aunque subsiguientemente replicados de forma no recombinante, todavía se consideran recombinantes para los fines de la invención.

De forma similar, una “proteína recombinante” es una proteína obtenida usando técnicas recombinantes, por ejemplo mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante como se representa anteriormente. Una proteína recombinante se distingue de la proteína de origen natural en al menos una o más características. La proteína se puede aislar o purificar lejos de algunas o de la mayoría de las proteínas y compuestos con los que está normalmente asociada en su hospedante de tipo salvaje, y de este modo puede ser sustancialmente pura. Una proteína aislada no está acompañada de al menos parte del material con el que normalmente está asociada en su estado natural, constituyendo preferentemente al menos alrededor de 0,5%, más preferentemente al menos alrededor de 5% en peso de la proteína total en una muestra dada. Una proteína sustancialmente pura comprende al menos alrededor de 75% en peso de la proteína total, prefiriéndose al menos alrededor de 80%, y prefiriéndose particularmente al menos alrededor de 90%. La definición incluye la producción de una proteína CS1 a partir de un organismo en un organismo o célula hospedante diferente. Como alternativa, la proteína se puede obtener a una concentración significativamente mayor que la que se observa normalmente, a través del uso de un promotor inducible o un promotor de expresión elevada, de manera que la proteína se obtiene a mayores niveles de concentración. Como alternativa, la proteína puede estar en una forma no encontrada normalmente en la naturaleza, como en la adición de una etiqueta epitópica o sustituciones, inserciones y supresiones de aminoácidos, como se discute más abajo.

El término “heterólogo”, cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más secuencias que no se encuentran normalmente en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico se produce típicamente de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias, por ejemplo, procedente de genes no relacionados dispuestos para obtener un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo un promotor procedente de una fuente, y una región codificante procedente de otra fuente. De forma similar, a menudo una proteína heteróloga se referirá a dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un “promotor” es típicamente un conjunto de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa aquí, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cercanas al sitio de partida de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente potenciadores distales o elementos represores, que pueden estar localizados tanto como varios miles de pares de bases desde el sitio de partida de la transcripción. Un promotor “constitutivo” es un promotor que es activo en la mayoría de las condiciones medioambientales y de desarrollo. Un promotor “inducible” es activo bajo regulación medioambiental o de desarrollo. La expresión

“enlazado de forma operable” se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o conjunto de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, por ejemplo en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico que corresponde a la segunda secuencia.

Un “vector de expresión” es un constructo de ácido nucleico, generado recombinante o sintéticamente, con una serie de elementos de ácidos nucleicos específicos que permite la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula hospedante. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o fragmento de ácido nucleico. Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a transcribir enlazado operablemente a un promotor.

La expresión “se hibrida selectivamente (o específicamente) a” se refiere a la unión, formación de un dúplex, o hibridación de una molécula selectivamente a una secuencia nucleotídica particular en condiciones de hibridación restrictivas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, ADN o ARN celular o de librería total).

La expresión “condiciones de hibridación restrictivas” se refiere a condiciones en las que una sonda se hibridará a su subsecuencia diana, típicamente en una mezcla compleja de ácidos nucleicos, pero no a otras secuencias. Las condiciones restrictivas dependen de la secuencia, y serán diferentes en circunstancias diferentes. Las secuencias más largas se hibridan específicamente a mayores temperaturas. En “Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid assays” en Tijssen (1993) *Hybridization with Nucleic Probes (Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology)* (vol. 24) Elsevier, se encuentra una guía amplia para la hibridación de ácidos nucleicos. Generalmente, las condiciones restrictivas se seleccionan para que sean alrededor de 5-10°C más bajas que el punto de fusión térmico (T_m) para la secuencia específica a una fuerza iónica y pH definidos. La T_m es la temperatura (en fuerza iónica definida, pH, y concentración nucleica) a la que el 50% de las sondas complementarias a la diana se hibridan a la secuencia diana en el equilibrio (ya que las secuencias diana están presentes en exceso, a T_m , el 50% de las sondas están ocupadas en el equilibrio). Las condiciones restrictivas serán aquellas en las que la concentración de sal es menor que alrededor de 1,0 M de ion sodio, típicamente alrededor de 0,01-1,0 M de concentración de ion sodio (u otras sales) a pH 7,0 a 8,3, y la temperatura es al menos alrededor de 30°C para sondas cortas (por ejemplo, alrededor de 10-50 nucleótidos) y al menos alrededor de 60°C para sondas largas (por ejemplo, mayor que alrededor de 50 nucleótidos). Las condiciones restrictivas también se pueden lograr con la adición de agentes desestabilizantes tales como formamida. Para la hibridación selectiva o específica, una señal positiva es típicamente al menos dos veces el valor inicial, preferentemente 10 veces la hibridación inicial. Las condiciones de hibridación restrictivas ejemplares pueden ser las siguientes: 50% de formamida, 5x SSC, y 1% de SDS, incubando a 42°C, o 5x SSC, 1% de SDS, incubando a 65°C, con un lavado en 0,2x SSC, y 0,1% de SDS a 65°C. Para la PCR, una temperatura de alrededor de 36°C es típica para la amplificación de baja restricción, aunque las temperaturas de hibridación pueden variar entre alrededor de 32°-48°C dependiendo de la longitud del cebador. Para la amplificación mediante PCR de restricción elevada, es típica una temperatura de alrededor de 62°C, aunque las temperaturas de hibridación de alta restricción pueden oscilar de alrededor de 50-65°C, dependiendo de la longitud y especificidad del cebador. Las condiciones del ciclo típicas para amplificaciones de restricción tanto elevada como baja incluyen una fase de desnaturalización de 90-95°C durante 30-120 segundos, una fase de hibridación que dura 30-120 segundos, y una fase de extensión de alrededor de 72°C durante 1-2 min. En Innis, *et al.* (1990) *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* Academic Press, NY, por ejemplo, se proporcionan protocolos y guías para reacciones de amplificación de restricción baja y elevada.

Los ácidos nucleicos que no se hibridan entre sí en condiciones restrictivas, todavía son sustancialmente idénticos si los péptidos que codifican son sustancialmente idénticos. Esto ocurre, por ejemplo, cuando se crea una copia de un ácido nucleico usando la máxima degeneración del codón permitida por el código genético. En tales casos, los ácidos nucleicos se hibridan típicamente en condiciones de hibridación moderadamente restrictivas. Las “condiciones de hibridación moderadamente restrictivas” ejemplares incluyen una hibridación en un tampón de formamida al 40%, NaCl 1M, SDS al 1% a 37°C, y un lavado en 1X SSC a 45°C. Una hibridación positiva es típicamente al menos dos veces la inicial. Para proporcionar condiciones de restricción similar, se pueden utilizar condiciones de hibridación y de lavado alternativas. En numerosas referencias, por ejemplo Ausubel, *et al.* (eds. 1991 y suplementos) *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley, se proporcionan guías adicionales para determinar los parámetros de la hibridación.

La frase “cambios en la morfología celular” o “cambios en las características celulares” se refiere a cualquier cambio en la morfología celular o características de proliferación *in vitro* o *in vivo*, tal como viabilidad celular, crecimiento celular, secreción de factores de crecimiento o de quimiocinas, cambios en la morfología celular, ganancia o pérdida de marcadores específicos de la inflamación, capacidad para inducir o suprimir inflamación cuando se inyecta en hospedantes animales adecuados, y/o inducción de un estado mórbido en hospedantes adecuados, por ejemplo trastornos autoinmunitarios y afecciones cancerosas. Véase, por ejemplo, p. 231-241 en Freshney (1994) *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique* (2d ed.) Wiley-Liss.

“Células enfermas” se refiere a cambios fenotípicos espontáneos o inducidos que no implican necesariamente la

- captación de nuevo material genético. Por ejemplo, aunque se puede producir la formación de mieloma a partir de la infección con un virus transformante e incorporación de nuevo ADN genómico, o captación de ADN exógeno, también puede surgir espontáneamente o tras exposición a un agente, induciendo de ese modo la expresión o alteración de un gen existente. El crecimiento tumoral está asociado con cambios de expresión proteica y fenotípicos, tales como cambios morfológicos, crecimiento celular aberrante, y/o cambios no morfológicos. Véase Freshney (2000) *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique* (4ª ed.) Wiley-Liss. De forma similar, las células afectadas por procesos de enfermedades autoinmunitarias también están asociadas con cambios fenotípicos y de expresión proteica.
- Mediante una cantidad "efectiva" de una molécula, o un anticuerpo, o un fármaco, o agente farmacológicamente activo, o formulación farmacéutica, se quiere decir una cantidad suficiente de la molécula, anticuerpo, fármaco, agente o formulación para proporcionar el efecto deseado.
- Un "sujeto" o "paciente" se usa aquí de forma intercambiable, que se refiere a un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano.
- Como se usa aquí, el término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" se refiere a una proteína que consiste en uno o más polipéptidos codificados sustancialmente por genes inmunoglobulínicos. Los genes inmunoglobulínicos reconocidos incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa, gamma (IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄), delta, épsilon y mu, así como la miríada de genes de región variable V de inmunoglobulinas (como se indica más abajo, hay genes V tanto para las cadenas H –pesada- como L –ligera-). Las "cadenas ligeras" inmunoglobulínicas de longitud completa (alrededor de 25 Kd o 214 aminoácidos) son codificadas por un gen de la región variable, V-kappa o V-lambda, en el término NH₂ (alrededor de 110 aminoácidos), y, respectivamente, un gen de región constante kappa o lambda en el término COOH. Las "cadenas pesadas" inmunoglobulínicas de longitud completa (alrededor de 50 Kd o 446 aminoácidos) son codificadas de forma similar por un gen de la región variable (alrededor de 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente, por ejemplo gamma (que codifica alrededor de 330 aminoácidos).
- Una forma de inmunoglobulina constituye la unidad estructural básica de un anticuerpo. Esta forma es un tetrámero, que consiste en dos pares idénticos de cadenas inmunoglobulínicas, teniendo cada par una cadena ligera y una cadena pesada. En cada par, las regiones variables de la cadena ligera y pesada son responsables conjuntamente de la unión a un antígeno, y las regiones constantes son responsables de las funciones efectoras del anticuerpo. Además de los anticuerpos tetraméricos, pueden existir inmunoglobulinas en una variedad de otras formas, incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab, y (Fab')₂, así como anticuerpos híbridos bifuncionales (por ejemplo Lanzavecchia *et al.*, *Eur. J. Immunol.* 17, 105 (1987)) y en cadenas individuales (por ejemplo Huston *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85, 5879-5883 (1988) y Bird *et al.* *Science*, 242, 423-426 (1988)). (Véase, generalmente, Hood *et al.*, "Immunology", Benjamin, N.Y., 2ª ed. (1984), y Hunkapiller y Hood, *Nature*, 323, 15-16 (1986)).
- También existen anticuerpos, por ejemplo como un número de fragmentos bien caracterizados, producidos por digestión con diversas peptidasas. De este modo, por ejemplo la pepsina digiere un anticuerpo por debajo de los enlaces de disulfuro en la región bisagra para producir F(ab')₂, un dímero de Fab, que él mismo es una cadena ligera unida a V_H-C_H mediante un enlace de disulfuro. El F(ab')₂ se puede reducir en condiciones leves para romper el enlace de disulfuro en la región bisagra, convirtiendo de ese modo el dímero de F(ab')₂ en un monómero de Fab'. El monómero de Fab' es esencialmente Fab con parte de la región bisagra (véase Paul (ed. 1999) *Fundamental Immunology* (4ª ed.) Raven. Aunque se definen diversos fragmentos de anticuerpos en términos de la digestión de un anticuerpo intacto, un experto apreciará que tales fragmentos se pueden sintetizar de novo ya sea químicamente o usando metodología de ADN recombinante. De este modo, el término anticuerpo, como se usa aquí, también incluye fragmentos de anticuerpos producidos mediante la modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados de novo usando metodologías de ADN recombinante (por ejemplo, Fv monocatenario), o aquellos identificados usando librerías de presentación de fagos (véase, por ejemplo, McCafferty, *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554).
- Un "anticuerpo quimérico" es una molécula de anticuerpo en la que (a) la región constante, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada, de manera que el sitio de unión al antígeno (región variable) está enlazado a una región constante de una clase, y/o especie diferente o alterada, o una molécula completamente diferente que confiere nuevas propiedades al anticuerpo quimérico, por ejemplo una enzima, toxina, hormona, factor de crecimiento, fármaco, función efectora, quimiotáctico, inmunomodulador, etc.; o (b) la región variable, o una porción de la misma, está alterada, sustituida o intercambiada con una región variable que tiene una especificidad diferente o alterada por el antígeno.
- La expresión "anticuerpo humanizado" o "inmunoglobulina humanizada" se refiere a una inmunoglobulina que comprende un entramado humano, al menos una y preferentemente todas las regiones que determinan la complementariedad (CDR) de un anticuerpo no humano, y en la que cualquier región constante presente es sustancialmente idéntica a una región constante de inmunoglobulina humana, es decir, al menos alrededor de 85-90%, preferentemente al menos 95% idéntica. Por tanto, todas las partes de la inmunoglobulina humanizada,

excepto posiblemente las CDR, son sustancialmente idénticas a partes correspondientes de una o más secuencias inmunoglobulínicas humanas nativas. Véanse, por ejemplo, Queen *et al.*, patentes US n^{os} 5.530.1.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370.

5 Para la preparación de anticuerpos, por ejemplo anticuerpos recombinantes, monoclonales, o policlonales, se conocen muchas técnicas. Véanse, por ejemplo, Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256:495-497; Kozbor, *et al.* (1983) *Immunology Today* 4:72; Cole, *et al.* (1985) p. 77-96 en Reisfeld y Sell (1985) *Monoclonal Antibodies and Myeloma Therapy* Liss; Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Lippincott; Harlow y Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* CSH Press; y Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2^a ed.) Academic Press. Las técnicas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente U.S. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos para polipéptidos de esta invención. También, se pueden usar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanizados. Como alternativa, se puede usar la tecnología de presentación de fagos para identificar anticuerpos y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados. Véanse, por ejemplo, McCafferty, *et al.* (1990) *Nature* 348:552-554; Marks, *et al.* (1992) *Biotechnology* 10: 779-783.

El término "epítipo" se refiere a cualquier porción (determinante) de una proteína que es capaz de provocar una respuesta inmunitaria, y que es capaz de unirse específicamente mediante un anticuerpo. Los determinantes epitópicos consisten habitualmente en agrupamientos de superficie activos de moléculas tales como aminoácidos o cadenas laterales de GAG, y habitualmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Se afirma que dos anticuerpos se unen a sustancialmente el mismo epítipo de una proteína (o al epítipo solapante de una proteína) si las mutaciones de aminoácidos en la proteína que reducen o eliminan la unión de un anticuerpo también reducen o eliminan la unión del otro anticuerpo, y/o si los anticuerpos compiten por la unión a la proteína, es decir, la unión de un anticuerpo a la proteína reduce o elimina la unión del otro anticuerpo. La determinación de si dos anticuerpos se unen sustancialmente al mismo epítipo se logra por métodos conocidos en la técnica, tales como un ensayo de competición. Al llevar a cabo un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de control (por ejemplo, uno de los anticuerpos anti-CS1 descritos aquí) y cualquier anticuerpo de ensayo, se puede marcar en primer lugar el anticuerpo de control con un marcador detectable, tal como biotina, un marcador enzimático, un marcador radiactivo, o un marcador fluorescente, para permitir la identificación subsiguiente. Un anticuerpo de ensayo (no marcado) que se une sustancialmente al mismo epítipo que el anticuerpo de control (marcado) debería ser capaz de bloquear la unión del anticuerpo de control, y de este modo debería de reducir la unión del anticuerpo de control.

35 En una forma de realización ejemplar, si un anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo de un anticuerpo monoclonal anti-CS1 de la presente invención, el anticuerpo se debería de unir a un epítipo de CS1 que solapa con el epítipo de CS1 al que se une el anticuerpo monoclonal Luc. La región que solapa puede oscilar desde un resto de aminoácido a varios cientos de restos de aminoácidos. Este anticuerpo debería entonces competir con y/o bloquear la unión del anticuerpo monoclonal Luc a CS1, y disminuir de ese modo la unión del anticuerpo monoclonal Luc a CS1, preferentemente en al menos alrededor del 50% en un ensayo de competición.

La expresión "derivado de" significa "obtenido de" o "producido mediante" o "que proviene de".

45 Antígenos y anticuerpos de CS1

SEC ID n^o:2 representa las secuencias de aminoácidos de la CS1 humana de tipo salvaje de longitud completa. Un fragmento o derivado de CS1 "funcionalmente activo" muestra una o más actividades funcionales asociadas con una proteína CS1 de tipo salvaje de longitud completa, tal como actividad antigénica o inmunogénica, capacidad para unirse a sustratos celulares naturales, etc. La actividad funcional de las proteínas CS1, derivados y fragmentos, se puede evaluar por diversos métodos conocidos por un experto en la materia (*Current Protocols in Protein Science*, Coligan *et al.*, eds., John Wiley & Sons, Inc., Somerset, Nueva Jersey (1998)). Para los fines aquí, los fragmentos funcionalmente activos también incluyen aquellos fragmentos que comprenden uno o más dominios estructurales de un polipéptido CS1, tal como un dominio de unión. Los dominios proteicos se pueden identificar usando el programa PFAM (Bateman A., *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 27: 260-2 (1999)).

Los derivados polipeptídicos de CS1 comparten típicamente un cierto grado de identidad de secuencia o similitud de secuencia con SEC ID n^o:2 o un fragmento de la misma. Los derivados de CS1 se pueden producir por diversos métodos conocidos en la técnica. Las manipulaciones que dan como resultado su producción se pueden producir a nivel génico o proteico. Por ejemplo, una secuencia génica de CS1 clonada (por ejemplo SEC ID n^o:1) se puede escindir en sitios apropiados con una endonucleasa o con endonucleasas de restricción (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA* 317: 415 (1986)), seguido de una modificación enzimática posterior, si se desea, y después se aísla, se liga *in vitro*, y se expresa para producir el derivado deseado. Como alternativa, un gen de CS1 se puede mutar *in vitro* o *in vivo* para crear y/o destruir secuencias de producción, iniciación, y/o de terminación, o para crear variaciones en regiones codificantes y/o para formar nuevos sitios de endonucleasas de restricción o destruir los preexistentes, para facilitar la modificación *in vitro* posterior. En la técnica se conoce

una variedad de técnicas de mutagénesis, tales como mutagénesis química, mutagénesis dirigida al sitio *in vitro* (Carter *et al.*, Nucl Acids Res. 13:4331(1986)), o el uso de ligadores TAB (disponibles de Pfizer, Inc.).

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

10 Existen las siguientes estirpes celulares de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, o Luc90. La estirpe celular de hibridoma Luc90 se ha depositado en la American Type Culture Collection (ATCC) en P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, con el número de acceso PTA 5091. El depósito de esta estirpe celular de hibridoma se recibió por la ATCC el 26 de marzo de 2003. La estirpe celular de hibridoma Luc63 también se ha depositado en la ATCC en la dirección dada
15 anteriormente. El depósito del anticuerpo Luc63 se recibió por la ATCC el 6 de mayo de 2004.

Se describen aquí anticuerpos monoclonales producidos por las estirpes celulares de hibridoma: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, o Luc90 (número de acceso de ATCC 5091). Estos anticuerpos monoclonales se nombran como los anticuerpos: Luc2, Luc3, Luc15, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, y Luc90, respectivamente, en lo sucesivo.

La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales que se unen sustancialmente al mismo epítipo como uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales Luc de la invención descritos aquí.

25 La presente descripción proporciona anticuerpos monoclonales que no se unen sustancialmente al mismo epítipo que uno o más de los anticuerpos monoclonales Luc de la invención.

30 Para identificar los anticuerpos que se unen a sustancialmente el mismo epítipo de un anticuerpo de la presente invención, o que se unen a un epítipo diferente de un anticuerpo de la presente invención, se puede usar una variedad de ensayos de identificación inmunológicos para la evaluación de la competición de anticuerpos.

Al llevar a cabo un estudio de competición de anticuerpos entre un anticuerpo de control y cualquier anticuerpo de ensayo (independientemente de la especie o isotipo), en primer lugar se puede marcar el control con un marcador detectable, tal como biotina o un marcador enzimático (o incluso radiactivo), para permitir la identificación subsiguiente. En este caso, se premezclaría o incubaría el anticuerpo no marcado con las células que expresan la proteína CS1. El anticuerpo marcado se añade entonces a las células incubadas previamente. Se mide la intensidad del marcador unido. Si el anticuerpo marcado compite con el anticuerpo no marcado por la unión a un epítipo que solapa, la intensidad disminuirá con relación a la unión mediante el anticuerpo no marcado de control negativo (un anticuerpo conocido que no se une a CS1).

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

50 La reactividad de los anticuerpos de control (marcados) en ausencia de un anticuerpo completamente irrelevante, sería el valor elevado del control. El valor bajo del control se obtendría incubando los anticuerpos de ensayo no marcados con células que expresan CS1, y después incubando la mezcla de células/anticuerpos con anticuerpos de control marcados de exactamente el mismo tipo, cuando la competición se produciría y reduciría la unión de los anticuerpos marcados. En un ensayo de evaluación, una reducción significativa en la reactividad de los anticuerpos marcados, en presencia de un anticuerpo de ensayo, es indicativa de que un anticuerpo de ensayo reconoce sustancialmente el mismo epítipo.

60 En la presente invención se incluyen anticuerpos frente a CS1 de todas las especies u orígenes. Los anticuerpos naturales ejemplares no limitantes incluyen anticuerpos derivados de ser humano, pollo, cabras, y roedores (por ejemplo, ratas, ratones, hámster y conejos), incluyendo roedores transgénicos manipulados genéticamente mediante ingeniería para producir anticuerpos humanos (véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO93/12227; patente US nº 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO91/10741; patente US nº 6.150.584).

65 Los anticuerpos naturales son los anticuerpos producidos por un animal hospedante tras ser inmunizado con un

antígeno, tal como un polipéptido, preferentemente un polipéptido humano. En una forma de realización preferida, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo natural aislado que se une a y neutraliza CS1.

5 Los anticuerpos anti-CS1 genéticamente alterados, deberían ser funcionalmente equivalentes a los anticuerpos naturales mencionados anteriormente. Se prefieren anticuerpos modificados que proporcionan estabilidad mejorada o/y eficacia terapéutica. Los ejemplos de anticuerpos modificados incluyen aquellos con sustituciones conservativas de restos de aminoácidos, y una o más supresiones o adiciones de aminoácidos que no alteran significativamente de forma perjudicial la utilidad de unión al antígeno. Las sustituciones pueden oscilar desde cambiar o modificar uno o más restos de aminoácidos hasta rediseñar completamente una región, en tanto que se mantenga la utilidad terapéutica. Los anticuerpos de esta invención se pueden modificar posttraduccionalmente (por ejemplo, acetilación y/o fosforilación), o se pueden modificar sintéticamente (por ejemplo, la unión de un grupo marcador). Los anticuerpos genéticamente alterados preferidos son anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados.

15 El anticuerpo quimérico es un anticuerpo que tiene una región variable y una región constante derivadas de dos anticuerpos diferentes, preferentemente derivadas de especies separadas. Preferentemente, la región variable del anticuerpo quimérico deriva de un murino, y la región constante deriva de un ser humano.

20 En una forma de realización, las regiones variables murinas derivan de uno cualquiera de los anticuerpos monoclonales de la invención descritos aquí. A fin de producir los anticuerpos quiméricos, las porciones derivadas de dos especies diferentes (por ejemplo, región constante humana y región variable o de unión murina) se pueden unir juntas químicamente mediante técnicas convencionales, o se pueden preparar como proteínas contiguas individuales usando técnicas de manipulación genética mediante ingeniería. Las moléculas de ADN que codifican las proteínas tanto de la porción de cadena ligera como de la porción de cadena pesada del anticuerpo quimérico se pueden expresar como proteínas contiguas. El método para obtener anticuerpos quiméricos se describe en la patente US nº 5.677.427; la patente US nº 6.120.767; y la patente US nº 6.329.508.

25 Los anticuerpos genéticamente alterados de la presente invención incluyen anticuerpos humanizados que se unen a y neutralizan CS1. En una forma de realización, dicho anticuerpo humanizado comprende las CDR de una inmunoglobulina de ratón donante, y los armazones de cadena pesada y de cadena ligera y las regiones constantes de una inmunoglobulina de aceptor humano. En un ejemplo, los anticuerpos humanizados son las versiones humanizadas de uno cualquiera de los anticuerpos de la invención descritos aquí. El método para obtener anticuerpos humanizados se describe en las patentes US nº 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.762; y 6.180.370.

35 También se incluyen en la presente invención anticuerpos anti-CS1 completamente humanos. En una forma de realización preferida de la presente invención, dichos anticuerpos completamente humanos se aíslan de anticuerpos humanos que neutralizan las actividades de CS1 descritas aquí.

40 Los anticuerpos completamente humanos frente a CS1 se producen mediante una variedad de técnicas. Un ejemplo es la metodología de trioma. El enfoque básico y una pareja de fusión celular ejemplar, SPAZ-4, para uso en este enfoque han sido descritos por Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, patente US nº 4.634.664; y Engleman *et al.*, patente US nº 4.634.666.

45 Los anticuerpos humanos frente a CS1 también se pueden producir a partir de animales transgénicos no humanos que tienen transgenes que codifican al menos un segmento del locus de la inmunoglobulina humana. La producción y propiedades de animales que tienen estas propiedades se describen con detalle por, véase, por ejemplo, Lonberg *et al.*, documento WO93/12227; patente US nº 5.545.806; y Kucherlapati, *et al.*, documento WO91/10741; patente US nº 6.150.584.

50 Para producir anticuerpos completamente humanos, también se pueden utilizar diversas tecnologías de librerías de anticuerpos recombinantes. Por ejemplo, un enfoque es identificar una librería de ADN procedente de células B humanas según el protocolo general esquematizado por Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989). Se seleccionan anticuerpos que se unen a CS1 o su fragmento. Después, las secuencias que codifican tales anticuerpos (o fragmentos de unión) se clonan y se amplifican. El protocolo descrito por Huse se hace más eficiente en combinación con tecnología de presentación de fago. Véanse, por ejemplo, Dower *et al.*, documento WO 91/17271 y Mc- Cafferty *et al.*, documento WO 92/01047; patente US nº 5.969.108.

60 En estos métodos, se producen librerías de fago en las que los miembros presentan diferentes anticuerpos en sus superficies externas. Los anticuerpos se presentan habitualmente como fragmentos Fv o Fab. Los anticuerpos de presentación de fago con una especificidad deseada se seleccionan mediante enriquecimiento por afinidad a CS1 o su fragmento.

65 También se pueden usar ribosomas eucariotas como medio para presentar una librería de anticuerpos y aislar los anticuerpos humanos de unión identificándolos frente al antígeno diana, tal como CS1, como se describe en Coia G, *et al.*, *J. Immunol. Methods* 1:254 (1-2): 191-7 (2001); Hanes J. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 18 (12):1287-92

(2000); Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95 (24):14130-5 (1998); Proc. NatL Acad. Sci. U. S. A. 94 (10):4937-42 (1997).

5 El sistema de levaduras también es adecuado para identificar proteínas segregadas o de la superficie celular de mamíferos, tales como anticuerpos. Las librerías de anticuerpos se pueden presentar sobre la superficie de células de levaduras con el fin de obtener los anticuerpos humanos frente a un antígeno diana. Este enfoque es descrito por Yeung, *et al.*, Biotechnol. Prog. 18(2):212-20 (2002); Boeder, E. T., *et al.*, Nat. Biotechnol. 15(6):553-7 (1997).

10 Como alternativa, las librerías de anticuerpos humanos se pueden expresar intracelularmente y se pueden identificar vía un sistema de dos híbridos de levadura (documento WO0200729A2).

15 Los fragmentos de los anticuerpos anti-CS1, que retienen la especificidad de unión a CS1, también se incluyen en la presente invención. Los ejemplos de estos fragmentos que se unen a antígenos incluyen, pero no se limitan a, cadenas pesadas o cadenas ligeras parciales o completas, regiones variables, o regiones de CDR de cualesquiera anticuerpos anti-CS1 de la invención descritos aquí.

20 En una forma de realización preferida de la invención, los fragmentos de anticuerpos son cadenas truncadas (truncadas en el extremo carboxílico). Preferentemente, estas cadenas truncadas poseen una o más actividades inmunoglobulínicas (por ejemplo, actividad de fijación del complemento). Los ejemplos de cadenas truncadas incluyen, pero no se limitan a, fragmentos Fab (que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH1); fragmentos Fd (que consisten en los dominios VH y CH1); fragmentos Fv (que consisten en los dominios VL y VH de una cadena individual de un anticuerpo); fragmentos dab (que consisten en un dominio VH); regiones de CDR aisladas; fragmentos (Fab)₂, fragmentos bivalentes (que comprenden dos fragmentos Fab enlazados mediante un puente de disulfuro en la región bisagra). Las cadenas truncadas se pueden producir mediante técnicas de bioquímica convencionales, tales como escisión enzimática, o técnicas de ADN recombinante, cada una de las cuales es conocida en la técnica. Estos fragmentos polipeptídicos se pueden producir mediante escisión proteolítica de anticuerpos intactos por métodos bien conocidos en la técnica, o insertando codones de parada en las condiciones deseadas en los vectores usando mutagénesis dirigida al sitio, tales como después de CH1 para producir fragmentos Fab, o después de la región bisagra para producir fragmentos (Fab')₂. Los anticuerpos monocatenarios se pueden producir uniendo las regiones que codifican V_L y V_H con un ADN que codifica un ligador peptídico que conecta los fragmentos proteicos de VL y VH.

25
30

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

40 Los anticuerpos anti-CS1 de la invención se pueden usar en inmunotoxinas. Los conjugados que son inmunotoxinas que incluyen anticuerpos se han descrito ampliamente en la técnica. Las toxinas se pueden acoplar a los anticuerpos mediante técnicas de acoplamiento convencionales, o las inmunotoxinas que contienen porciones de toxinas proteínicas se pueden producir como proteínas de fusión. Los conjugados de la presente invención se pueden usar de una manera correspondiente para obtener tales inmunotoxinas. Ilustrativas de tales inmunotoxinas son aquellas descritas por Byers, B. S. *et al.*, Seminars Cell Biol 2:59-70 (1991) y por Fanger, M. W. *et al.*, Immunol Today 12:51-54 (1991).

45

50 Para producir los anticuerpos anti-CS1 recombinantes, así como los anticuerpos anti-CS1 quiméricos o humanizados, o cualesquiera otros anticuerpos anti-CS1 genéticamente alterados, y sus fragmentos o conjugados, en cualesquiera sistemas de expresión, incluyendo sistemas de expresión tanto procariotas como eucariotas, tales como bacterias, levaduras, células de insectos, células vegetales y células de mamífero (por ejemplo, células NSO), se pueden usar técnicas de ADN recombinante.

55 Una vez producidos, los anticuerpos completos, sus dímeros, las cadenas ligera y pesada individuales, u otras formas inmunoglobulínicas de la presente invención se pueden purificar de acuerdo con procedimientos estándar de la técnica, incluyendo precipitación con sulfato de amonio, columnas de afinidad, cromatografía en columna, electroforesis en gel y similares (véase, por ejemplo, Scopes, R., Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)). Se prefieren las inmunoglobulinas sustancialmente puras de al menos alrededor de 90 a 95% de homogeneidad, y muy preferidas de 98 a 99% o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos. Una vez purificados, parcialmente o hasta la homogeneidad como se desee, los polipéptidos se pueden usar entonces terapéuticamente (incluyendo extracorpóreamente) o para desarrollar y llevar a cabo procedimientos de ensayo, tinción inmunofluorescente, y similar. (Véase, generalmente, Immunological Methods, Vols. I and II (Lefkovits y Pernis, eds., Academic Press, NY, 1979 y 1981)). Los anticuerpos anti-CS1 aislados o purificados se pueden identificar posteriormente en busca de su capacidad para neutralizar las actividades biológicas de CS1 como se describe en los Ejemplos).

60
65

Uso de ácidos nucleicos de CS1

5 Como se describe anteriormente, las secuencias de CS1 se identifican inicialmente mediante homología de secuencia de ácido nucleico y/o aminoácidos sustancial, o con relación a las secuencias de CS1 de la Tabla 2. Tal homología se puede basar en la secuencia global de ácido nucleico o de aminoácidos, y generalmente se determina usando programas de homología o condiciones de hibridación. Típicamente, las secuencias enlazadas en un ARNm se encuentran en la misma molécula.

10 El porcentaje de identidad de una secuencia se puede determinar usando un algoritmo tal como BLAST. Un método preferido utiliza el módulo BLASTN de WU-BLAST-2 ajustado a los parámetros por defecto, con una extensión de solapamiento y una fracción de solapamiento ajustadas a 1 y 0,125, respectivamente. El alineamiento puede incluir la introducción de saltos en las secuencias a alinear. Además, para secuencias que contienen más nucleótidos o unos pocos nucleótidos que aquellos de los ácidos nucleicos descritos, el porcentaje de homología se puede determinar basándose en el número de nucleósidos homólogos con relación al número total de nucleósidos. De este modo, por ejemplo, la homología de secuencias más cortas que aquellas de las secuencias identificadas se determinará usando el número de nucleósidos en la secuencia más corta.

15 La homología de ácidos nucleicos se puede determinar mediante estudios de hibridación. De este modo, por ejemplo, los ácidos nucleicos que se hibridan con restricción elevada a un ácido nucleico descrito, o su complemento, o también se encuentran en los ARNm de origen natural, se consideran una secuencia homóloga. Como alternativa, se usan condiciones de hibridación menos restrictivas; por ejemplo, se pueden usar condiciones de restricción moderada o baja; véase Ausubel, más arriba, y Tijssen, más arriba.

20 Las secuencias de ácidos nucleicos de CS1, por ejemplo las secuencias en la Tabla 2, pueden ser fragmentos de genes más grandes, por ejemplo, son segmentos de ácidos nucleicos. "Genes" en este contexto incluye regiones codificantes, regiones no codificantes, y mezcla de regiones codificantes y no codificantes. En consecuencia, usando las secuencias proporcionadas aquí, se pueden obtener secuencias extendidas, en cualquier dirección, de los genes de CS1, usando técnicas bien conocidas para clonar secuencias más largas o las secuencias de longitud completa; véase Ausubel, *et al.*, más arriba. Se puede hacer mucho mediante la informática, y muchas secuencias se pueden agrupar para incluir secuencias múltiples que corresponden a un único gen, por ejemplo sistemas tales como UniGene.

25 Los ácidos nucleicos de CS1 se usan de varias maneras. De una manera, las sondas de ácido nucleico para CS1 se obtienen y se unen a biochips para ser usadas en métodos de identificación y de diagnóstico, como se esquematiza más abajo, o para la administración, por ejemplo para terapia génica, vacuna, ARNi y/o aplicaciones antisentido. Como alternativa, los ácidos nucleicos de CS1 que incluyen regiones codificantes de la proteína CS1 se pueden poner en vectores de expresión para la expresión de la proteína CS1, nuevamente con fines de identificación o para la administración a un paciente.

30 Se pueden realizar sondas de ácidos nucleicos para el ácido nucleico de CS1 (tanto las secuencias de ácidos nucleicos esquematizados en las figuras y/o sus complementos). Las sondas de ácidos nucleicos unidas al biochip se diseñan para que sean sustancialmente complementarias al ácido nucleico de CS1, por ejemplo, la secuencia diana (ya sea la secuencia diana de la muestra o a otras secuencias de sondas, por ejemplo en ensayos de sandwich), de manera que se produzca la hibridación de la secuencia diana y las sondas. Como se esquematiza más abajo, esta complementariedad no necesita ser perfecta; puede haber cualquier número de desemparejamientos de pares de bases que interferirán con la hibridación entre la secuencia diana y los ácidos nucleicos monocatenarios.

35 Sin embargo, si el número de mutaciones es tan grande que no se puede producir la hibridación incluso en las condiciones de hibridación menos restrictivas, la secuencia no es una secuencia diana complementaria. De este modo, por "sustancialmente complementaria" se quiere decir aquí que las sondas son suficientemente complementarias a las secuencias diana para hibridarse en condiciones de reacción normales, particularmente condiciones de restricción elevada, como se esquematiza aquí.

40 Una sonda de ácido nucleico es generalmente monocatenaria, pero puede ser parcialmente monocatenaria y parcialmente bicatenaria. El tipo de hebra de la sonda está dictado por la estructura, composición, y propiedades de la secuencia diana. En general, las sondas de ácidos nucleicos tienen una longitud de alrededor de 8-100 bases, prefiriéndose desde alrededor de 10-80 bases, y siendo particularmente preferida desde alrededor de 30-50 bases. Esto es, generalmente no se usan genes completos. Algunas veces, se pueden usar ácidos nucleicos más largos, hasta cientos de bases.

45 Se puede usar más de una sonda por secuencia, usándose sondas que solapan o sondas para diferentes secciones de la diana. Esto es, se usan dos, tres, cuatro o más sondas, prefiriéndose tres para construir una redundancia para una diana particular. Las sondas pueden solapar (por ejemplo, tener cierta secuencia en común), o separadas. En algunos casos, para amplificar la señal para una mayor sensibilidad, se pueden usar cebadores de PCR.

- Los ácidos nucleicos se pueden unir o inmovilizar a un soporte sólido de muchas maneras. Por “inmovilizar” y equivalentes gramaticales se quiere decir aquí que la asociación o unión entre la sonda de ácido nucleico y el soporte sólido es suficiente para ser estable en las condiciones de unión, lavado, análisis y eliminación, como se esquematiza. La unión puede ser típicamente covalente, o no covalente. Por “unión no covalente”, y equivalentes gramaticales, se quiere decir aquí una o más interacciones electrostáticas, hidrófilas, e hidrófobas. Incluida en la unión no covalente es la unión covalente de una molécula, por ejemplo estreptavidina, al soporte, y la unión no covalente de la sonda biotinilada a estreptavidina. Por “unión covalente” y equivalentes gramaticales se quiere decir aquí que los dos restos, el soporte sólido y la sonda, se unen mediante al menos un enlace, incluyendo enlaces sigma, enlaces pi, y enlaces de coordinación. Los enlaces covalentes se pueden formar directamente entre la sonda y el soporte sólido, o se pueden formar mediante un agente de reticulación o mediante inclusión de un grupo reactivo específico en el soporte sólido o la sonda o ambas moléculas. La inmovilización también puede implicar una combinación de interacciones covalente y no covalentes.
- En general, las sondas se unen al biochip de muchas maneras. Como se describe aquí, los ácidos nucleicos pueden sintetizarse primero, con unión subsiguiente al biochip, o se pueden sintetizar directamente sobre el biochip.
- El biochip comprende un sustrato sólido adecuado. Por “sustrato” o “soporte sólido” u otros equivalentes gramaticales se quiere decir aquí un material que se puede modificar para la unión o asociación de las sondas de ácidos nucleicos, y es susceptible a al menos un método de detección. A menudo, el sustrato puede contener sitios individuales discretos apropiados para la división e identificación individuales. El número de sustratos posibles es muy grande, e incluye, pero no se limitan a, vidrio y vidrio modificado o funcionalizado, plásticos (incluyendo acrílicos, poliestireno y copolímeros de estireno y otros materiales, polipropileno, polietileno, polibutileno, poliuretanos, teflón J, etc.), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, resinas, sílice o materiales a base de sílice, incluyendo sílice y sílice modificado, carbono, metales, vidrios inorgánicos, plásticos, etc.). En general, los sustratos permiten la detección óptica y no fluorescen apreciablemente. Véase el documento WO 0055627).
- Generalmente, el sustrato es plano, aunque se pueden usar igualmente otras configuraciones de sustratos. Por ejemplo, las sondas se pueden colocar en la superficie interior de un tubo para el análisis de muestras de flujo a través, para minimizar el volumen de la muestra. De forma similar, el sustrato puede ser flexible, tal como una espuma flexible, incluyendo espumas de celdas cerradas hechas de plásticos particulares.
- La superficie del biochip y la sonda se pueden derivatizar con grupos funcionales químicos para la unión subsiguiente de los dos. De este modo, por ejemplo, el biochip se derivatiza con un grupo funcional químico, incluyendo, pero sin limitarse a, grupos amino, grupos carboxi, grupos oxo, y grupos tiol, siendo particularmente preferidos los grupos amino. Usando estos grupos funcionales, las sondas se pueden unir usando grupos funcionales sobre las sondas. Por ejemplo, los ácidos nucleicos que contienen grupos amino se pueden unir a superficies que comprenden grupos amino, por ejemplo usando ligadores; por ejemplo ligadores homo- o heterobifuncionales, como es bien conocido (véase catálogo de 1994 de Pierce Chemical Company, sección técnica sobre reticuladores, páginas 155-200). Además, en algunos casos, se pueden usar ligadores adicionales, tales como grupos alquilo (incluyendo grupos sustituidos y heteroalquílicos).
- Los oligonucleótidos se sintetizan, y después se unen a la superficie del soporte sólido. Se puede unir el término 5' o 3' al soporte sólido, o la unión puede ser vía enlace a un nucleósido interno. La inmovilización al soporte sólido puede ser muy fuerte, aunque no covalente. Por ejemplo, se pueden obtener oligonucleótidos biotinilados, que se unen a superficies revestidas covalentemente con estreptavidina, dando como resultado la unión.
- Como alternativa, los oligonucleótidos se pueden sintetizar en la superficie. Por ejemplo, se usan técnicas de fotoactivación que utilizan compuestos y técnicas de fotopolimerización. Los ácidos nucleicos se pueden sintetizar in situ, usando técnicas fotolitoográficas conocidas, tales como las descritas en los documentos WO 95/25116; WO 95/35505; las patentes US nº 5.700.637 y nº 5.445.934 **y las referencias mencionadas en los mismos**; estos métodos de unión forman la base de la tecnología de Affymetrix GENECHIP® (chip de microconjuntos de ADN).
- A menudo, se llevan a cabo ensayos a base de amplificación para medir el nivel de expresión de secuencias asociadas a CS1. Estos ensayos se llevan a cabo típicamente conjuntamente con transcripción inversa. En tales ensayos, una secuencia de ácido nucleico asociada a CS1 actúa como un molde en una reacción de amplificación (por ejemplo, reacción en cadena de la polimerasa o PCR). En una amplificación cuantitativa, la cantidad de producto de la amplificación será proporcional a la cantidad de molde en la muestra original. La comparación con controles apropiados proporciona una medida de la cantidad de ARN asociado a CS1. Los métodos de amplificación cuantitativa son bien conocidos. Los protocolos detallados para la PCR cuantitativa se proporcionan, por ejemplo, en Innis, *et al.* (1990) PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications Academic Press.

Para medir la expresión, se puede usar un ensayo a base de TAQMAN® (una sonda oligonucleotídica fluorogénica). Los ensayos a base de TAQMAN® usan una sonda oligonucleotídica fluorogénica que contiene un colorante fluorescente en 5' y un agente de apagado en 3'. La sonda se hibrida a un producto de PCR, pero no se puede extender por sí misma a un agente de bloqueo en el extremo 3'. Cuando el producto de la PCR se amplifica en ciclos subsiguientes, la actividad de nucleasa de 5' de la polimerasa, por ejemplo AMPLITAQ® (ADN polimerasa), da como resultado la escisión de la sonda TAQMAN®. Esta escisión separa el colorante fluorescente en 5' y el agente de apagado en 3', dando como resultado de ese modo un incremento en la fluorescencia en función de la amplificación (véase, por ejemplo, la bibliografía proporcionada por Perkin-Elmer).

Otros métodos de amplificación adecuados incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de ligasa (LCR) (véanse Wu y Wallace (1989) *Genomics* 4:560-569, Landegren, *et al.* (1988) *Science* 241:1077-1080, y Barringer, *et al.* (1990) *Gene* 89:117-122), amplificación de la transcripción (Kwoh, *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173-1177), replicación de secuencia autosostenida (Guatelli, *et al.* (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:1874-1878), PCR de punto, PCR de adaptador ligador, etc.

Expresión de la proteína CS1 a partir de ácidos nucleicos

El ácido nucleico de CS1, por ejemplo que codifica la proteína CS1, se puede usar para obtener una variedad de vectores de expresión para expresar la proteína CS1, la cual se puede usar entonces en reactivos de desarrollo para ensayos de diagnóstico como se describe más abajo. Los vectores de expresión y la tecnología de ADN recombinante son bien conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, más arriba, y Fernandez y Hoeffler (eds.1999) *Gene Expression Systems Academic Press*) para expresar proteínas. Los vectores de expresión pueden ser vectores extracromosómicos que se autorreplican, o vectores que se integran en un genoma hospedante. Generalmente, estos vectores de expresión incluyen un ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional enlazado operablemente al ácido nucleico que codifica la proteína CS1. La expresión "secuencias de control" se refiere a secuencias de ADN usadas para la expresión de una secuencia codificante operablemente enlazada en un organismo hospedante particular. La secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen una secuencia promotora, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Se conocen células eucariotas para utilizar promotores, señales de poliadenilación, y potenciadores.

Un ácido nucleico está "operablemente enlazado" cuando se coloca en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está operablemente enlazado a ADN para un polipéptido si es expresado como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado operablemente a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión al ribosoma está enlazado operablemente a una secuencia codificante si está situado para facilitar la traducción. Generalmente, "operablemente enlazado" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas, y, en el caso de un líder secretor, contiguas y en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlazamiento se logra típicamente mediante ligación en sitios de restricción convenientes. Si no existen tales sitios, se usan adaptadores o ligadores oligonucleotídicos sintéticos, según la práctica convencional. El ácido nucleico regulador transcripcional y traduccional generalmente será apropiado para la célula hospedante usada para expresar la proteína CS1. Se conocen numerosos tipos de vectores de expresión apropiados y secuencias reguladoras adecuadas para una variedad de células hospedantes.

En general, las secuencias reguladoras transcripcionales y traduccionales pueden incluir, pero sin limitarse a, secuencias promotoras, sitios de unión al ribosoma, secuencias de comienzo y de parada transcripcionales, secuencias de comienzo y de parada traduccionales, y secuencias potenciadoras o activadoras. Las secuencias reguladoras pueden incluir un promotor y secuencias de comienzo y de parada transcripcionales.

Las secuencias promotoras pueden ser promotores constitutivos o inducibles. Los promotores pueden ser promotores de origen natural, o promotores híbridos. Los promotores híbridos, que combinan elementos de más de un promotor, son también conocidos, y son útiles.

Un vector de expresión puede comprender elementos adicionales. Por ejemplo, el vector de expresión puede tener dos sistemas de replicación, permitiendo así que se mantenga en dos organismos, por ejemplo en células de mamífero o de insectos para la expresión, y en un hospedante procarionte para la clonación y la amplificación. Además, para vectores de expresión integradores, el vector de expresión contiene a menudo al menos una secuencia homóloga al genoma de la célula hospedante, y preferentemente dos secuencias homólogas que flanquean el constructo de expresión. El vector integrador se puede dirigir a un locus específico en la célula hospedante seleccionando la secuencia homóloga apropiada para la inclusión en el vector. Existen constructos para vectores integradores. Véanse, por ejemplo, Fernández y Hoeffler, más arriba y Kitamura, *et al.* (1995) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 92:9146-9150.

Además, el vector de expresión puede contener un gen marcador seleccionable, para permitir la selección de células hospedantes transformadas. Los genes de selección son bien conocidos, y variarán con la célula hospedante usada.

La proteína CS1 se produce habitualmente cultivando una célula hospedante transformada con un vector de expresión que contiene un ácido nucleico que codifica una proteína CS1, bajo las condiciones apropiadas para inducir o provocar la expresión de la proteína CS1. Las condiciones apropiadas para la expresión de la proteína CS1 variarán con la elección del vector de expresión y la célula hospedante, y se averiguarán fácilmente mediante experimentación normal u optimización. Por ejemplo, el uso de promotores constitutivos en el vector de expresión requerirá optimizar el crecimiento y proliferación de la célula hospedante, mientras que el uso de un promotor inducible requiere las condiciones de crecimiento apropiadas para la inducción. Además, algunas veces es importante el periodo de tiempo de la cosecha. Por ejemplo, los sistemas baculovíricos usados en la expresión de células de insectos son virus líticos, y de este modo la selección del tiempo de cosecha puede ser crucial para el rendimiento del producto.

Las células hospedantes apropiadas incluyen células de levadura, de bacterias, arqueobacterias, hongos, e insectos y animales, incluyendo células de mamíferos. Son de particular interés *Saccharomyces cerevisiae* y otras levaduras, *E. coli*, *Bacillus subtilis*, células Sf9, células C129, células 293, neurosporas, BHK, CHO, COS, células HeLa, HUVEC (células endoteliales de vena umbilical humana), células THP1 (una estirpe celular de macrófagos), y otras diversas células humanas y estirpes celulares.

Las proteínas CS1 se pueden expresar en células de mamífero. Se pueden usar sistemas de expresión de mamíferos, e incluyen sistemas retrovíricos y adenovíricos. Un sistema de vector de expresión es un sistema de vector retrovírico, tal como se describe generalmente en los documentos WO 97/27212 y WO 97/27213. Son de uso particular como promotores mamíferos los promotores de genes víricos de mamíferos, ya que los genes víricos son a menudo expresados en gran cantidad y tienen un amplio intervalo de hospedantes. Los ejemplos incluyen el promotor temprano de SV40, el promotor de LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal de adenovirus, el promotor del virus del herpes simple, y el promotor de CMV (véase, por ejemplo, Fernández y Hoeffler, más arriba). Típicamente, las secuencias de terminación de la transcripción y de poliadenilación reconocidas por células de mamíferos son regiones reguladoras situadas en 5' con respecto al codón de parada de la traducción, y de este modo, junto con los elementos promotores, coflanquean la secuencia codificante. Los ejemplos de señales terminadoras de la transcripción y de poliadenilación incluyen aquellas derivadas de SV40.

Existen métodos para introducir ácido nucleico exógeno en hospedantes de mamíferos, así como en otros hospedantes, y variarán con la célula hospedante usada. Las técnicas incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplastos, electroporación, infección vírica, encapsulamiento del polinucleótido o polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos.

La proteína CS1 se puede expresar en sistemas bacterianos. También se pueden usar promotores procedentes de bacteriófago. Además, también son útiles promotores sintéticos y promotores híbridos; por ejemplo, el promotor tac es un híbrido de las secuencias de los promotores trp y lac. Además, un promotor bacteriano puede incluir promotores naturales de origen no bacteriano que tienen la capacidad para unirse a ARN polimerasa bacteriana e iniciar la transcripción. Además de una secuencia promotora que funciona, es deseable un sitio de unión a ribosoma eficiente. El vector de expresión también puede incluir una secuencia peptídica señal que proporciona la secreción de la proteína CS1 en las bacterias. La proteína se segrega en el medio de crecimiento (bacterias grampositivas) o en el espacio periplásmico, situado entre la membrana interna y externa de la célula (bacterias gramnegativas). El vector de expresión bacteriano también puede incluir un gen marcador seleccionable, para permitir la selección de cepas bacterianas que se han transformado. Los genes de selección adecuados incluyen genes que hacen a la bacteria resistente a fármacos tales como ampicilina, cloramfenicol, eritromicina, kanamicina, neomicina, y tetraciclina. Los marcadores seleccionables incluyen genes biosintéticos, tales como aquellos en las rutas biosintéticas de histidina, triptófano, y leucina. Estos componentes se ensamblan en vectores de expresión. Los vectores de expresión para las bacterias son bien conocidos, e incluyen vectores para *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Streptococcus cremoris*, y *Streptococcus lividans*, entre otros (por ejemplo, Fernandez y Hoeffler, más arriba).

Los vectores de expresión bacterianos se transforman en células hospedantes bacterianas usando técnicas tales como tratamiento con cloruro de calcio, electroporación, y otros.

La proteína CS1 se puede producir en células de insectos, usando, por ejemplo, vectores de expresión para la transformación de células de insectos, y en particular vectores de expresión a base de baculovirus.

Una proteína CS1 también se puede producir en células de levaduras. Los sistemas de expresión de levaduras son bien conocidos, e incluyen vectores de expresión para *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* y *C. maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis* y *K. lactis*, *Pichia guillerimodii* y *P. pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe*, y *Yarrowia lipolytica*.

La proteína CS1 también se puede obtener como una proteína de fusión, usando técnicas disponibles. De este

modo, por ejemplo para la creación de anticuerpos monoclonales, si el epítipo deseado es pequeño, la proteína CS1 se puede fusionar a una proteína portadora para formar un inmunógeno. Como alternativa, la proteína CS1 se puede obtener como una proteína de fusión para incrementar la expresión, o para otras razones. Por ejemplo, cuando la proteína CS1 es un péptido CS1, el ácido nucleico que codifica el péptido se puede enlazar a otro ácido nucleico con fines de expresión. Se puede realizar la fusión con etiquetas epitópicas de detección, por ejemplo con FLAG, His6, myc, HA, etc.

La proteína CS1 se puede purificar o aislar después de la expresión. La proteína CS1 se puede aislar o purificar de muchas maneras, dependiendo de qué otros componentes están presentes en la muestra y los requisitos para el producto purificado, por ejemplo conformación natural o desnaturalizado. Los métodos de purificación estándar incluyen precipitaciones con sulfato de amonio, técnicas electroforéticas, moleculares, inmunológicas, y cromatográficas, incluyendo cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, de afinidad, y de HPLC de fase inversa, y cromatografía de intercambio. Por ejemplo, la proteína CS1 se puede purificar usando una columna con anticuerpo anti-proteína CS1 estándar. También son útiles las técnicas de ultrafiltración y diafiltración, conjuntamente con la concentración de proteína. Véanse, por ejemplo, Walsh (2002) *Proteins: Biochemistry and Biotechnology* Wiley; Hardin, *et al.* (eds. 2001) *Cloning, Gene Expression and Protein Purification* Oxford Univ. Press; Wilson, *et al.* (eds. 2000) *Encyclopedia of Separation Science* Academic Press; y Scopes (1993) *Protein Purification* Springer-Verlag. El grado de purificación necesaria variará dependiendo del uso de la proteína CS1. En algunos casos no será necesaria la purificación.

Una vez expresada y purificada, si es necesario, las proteínas y ácidos nucleicos CS1 son útiles en un número de aplicaciones. Se pueden usar como reactivos de inmunoselección, como reactivos de vacunas, como agentes de identificación, entidades terapéuticas, para la producción de anticuerpos, como inhibidores de la transcripción o de la traducción, etcétera.

Variantes de proteínas CS1

Entre las proteínas CS1 están variantes de aminoácidos de las secuencias de origen natural, como se determinan aquí. Preferentemente, las variantes son homólogas en más de alrededor del 75% con respecto a la secuencia de tipo salvaje, más preferentemente mayor que alrededor de 80%, incluso más preferentemente mayor que alrededor de 85%, y lo más preferible mayor que 90%. Algunas veces la homología será tan alta como alrededor de 93-95% o 98%. En cuanto a los ácidos nucleicos, la homología en este contexto significa similitud o identidad de secuencia, prefiriéndose la identidad. Esta homología se determinará usando técnicas estándar, como se esquematiza anteriormente para homologías de ácido nucleico.

La proteína CS1 puede ser más corta o más larga que las secuencias de aminoácidos de tipo salvaje. De este modo, en una forma de realización se incluyen en la definición de proteínas CS1 porciones o fragmentos de las secuencias de tipo salvaje aquí. Además, como se esquematiza anteriormente, el ácido nucleico CS1 se puede usar para obtener regiones codificantes adicionales, y de este modo secuencia proteica adicional.

Las proteínas CS1 pueden ser proteínas CS1 derivadas o variantes, en comparación con la secuencia de tipo salvaje. Esto es, como se esquematiza de forma más completa más abajo, el péptido CS1 derivado contendrá a menudo al menos una sustitución, supresión, o inserción de aminoácidos, siendo particularmente preferidas las sustituciones de aminoácidos. La sustitución, inserción o supresión de aminoácidos se puede producir en muchas posiciones de restos en el péptido CS1.

También se describen dentro de las proteínas CS1 de la presente invención las variantes de secuencias de aminoácidos. Estas variantes caen típicamente en una o más de tres clases: variantes de sustitución, de inserción, o de supresión. Estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis de nucleótidos específicas del sitio en el ADN que codifica la proteína CS1, usando mutagénesis de casete o de PCR, u otras técnicas, para producir ADN que codifica la variante, y después expresar el ADN en cultivo de células recombinantes como se explica anteriormente. Sin embargo, los fragmentos de proteína CS1 variantes que tienen hasta alrededor de 100-150 restos se pueden preparar mediante síntesis *in vitro* usando técnicas ya consolidadas. Las variantes de secuencias de aminoácidos se caracterizan por la naturaleza predeterminada de la variación, un rasgo que las deja aparte de la variación alélica o de interespecies de origen natural de la secuencia de aminoácidos de la proteína CS1. Las variantes muestran típicamente una actividad biológica cualitativa similar a un análogo de origen natural, aunque se pueden seleccionar variantes que tienen características modificadas.

Aunque el sitio o región para introducir una variación de secuencia de aminoácidos está predeterminado a menudo, la mutación per se no necesita estar determinada. Por ejemplo, a fin de optimizar el comportamiento de una mutación en un sitio dado, se pueden llevar a cabo mutagénesis al azar en el codón o región diana, y las variantes de CS1 expresadas se pueden identificar en busca de la combinación óptima de actividad deseada. Las técnicas para obtener mutaciones por sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas, por ejemplo mutagénesis del cebador M13 y mutagénesis de PCR. La identificación de los mutantes se realiza a menudo usando ensayos de actividades de proteína CS1.

Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos individuales; las inserciones serán habitualmente del orden de 1-20 aminoácidos, aunque se pueden tolerar inserciones considerablemente mayores. Las supresiones generalmente oscilan de alrededor de 1-20 restos, aunque en muchos casos las supresiones pueden ser mucho más grandes.

Las sustituciones, supresiones, inserciones, o sus combinaciones, se pueden usar para llegar a un derivado final. Generalmente, estos cambios se realizan en unos pocos aminoácidos para minimizar la alteración de la molécula. Sin embargo, en ciertas circunstancias se pueden tolerar cambios más grandes. Cuando se desean alteraciones pequeñas en las características de la proteína CS1, generalmente las sustituciones se realizan según las relaciones de sustituciones de aminoácidos descritas.

Las variantes presentan típicamente de forma esencial la misma actividad biológica cualitativa, y provocarán la misma respuesta inmunitaria que un análogo de origen natural, aunque también las variantes se seleccionan para modificar las características de las proteínas CS1 según sea necesario. Como alternativa, la variante se puede diseñar de manera que se altere la actividad biológica de la proteína CS1. Por ejemplo, se pueden añadir, alterar, o eliminar sitios de glucosilación.

Algunas veces se realizan cambios sustanciales en la función o en la identidad inmunológica seleccionando sustituciones que son menos conservativas que aquellas descritas anteriormente. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones que afectan de forma más significativa a: la estructura de la cadena principal polipeptídica en el área de la alteración, por ejemplo la estructura de hélice α o de lámina β ; a la carga o hidrofobia de la molécula en el sitio diana; o al volumen de la cadena lateral. Las sustituciones que generalmente se espera que produzcan los cambios más grandes en las propiedades del polipéptido son aquellas en las que (a) un resto hidrófilo, por ejemplo serina o treonina, es sustituido por (o con) un resto hidrófobo, por ejemplo leucina, isoleucina, fenilalanina, valina, o alanina; (b) una cisteína o prolina es sustituida por (o con) otro resto; (c) un resto que tiene una cadena lateral electropositiva, por ejemplo, lisina, arginina o histidina, es sustituido por (o con) un resto electronegativo, por ejemplo ácido glutámico o aspártico; (d) un resto que tiene una cadena lateral voluminosa, por ejemplo fenilalanina, es sustituido por (o con) uno que no tiene una cadena lateral, por ejemplo glicina; o (e) se incorpora o se sustituye un resto de prolina, que cambia el grado de libertad rotacional del enlace peptídico.

Las variantes presentan típicamente una actividad biológica cualitativa similar, y provocarán la misma respuesta inmunitaria que el análogo de origen natural, aunque también se seleccionan variantes para modificar las características de las proteínas CS1 de la piel, según se necesite. Como alternativa, la variante se puede diseñar de manera que se altere la actividad biológica de la proteína CS1. Por ejemplo, se pueden alterar o eliminar los sitios de glucosilación.

Se pueden realizar modificaciones covalentes de los polipéptidos CS1.

Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos seleccionados como dianas de un polipéptido CS1 con un agente derivatizante orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N- o C-terminales de un polipéptido CS1. La derivatización con agentes biofuncionales es útil, por ejemplo, para reticular polipéptidos CS1 a una matriz soporte insoluble en agua o a una superficie para uso en un método para purificar anticuerpos anti-polipéptido CS1 o para ensayos de identificación, como se describe de forma más completa más abajo. Los agentes de reticulación usados habitualmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(propionato de succinimidilo), maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano, y agentes tales como metil-3-((p-azidofenil)ditio)propioimidato.

Otras modificaciones incluyen la desamidación de restos glutaminílicos y asparaginílicos en restos glutamílicos y aspartílicos correspondientes, respectivamente, la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de restos de serinílicos, treonílicos, o tirosílicos, la metilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (por ejemplo, p. 79-86, Creighton (1992) Proteins: Structure and Molecular Properties Freeman), la acetilación de la amina N-terminal, y la amidación de un grupo carboxílico C-terminal.

Otro tipo de modificación covalente del polipéptido de CS1 comprende alterar el patrón de glucosilación nativo del polipéptido. "Alterar el patrón de glucosilación nativo", para los fines de esta memoria, quiere decir suprimir uno o más restos de hidratos de carbono encontrados en el polipéptido CS1 de secuencia nativa, y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el polipéptido CS1 de secuencia nativa. Los patrones de glucosilación se pueden alterar de muchas maneras. Diferentes tipos celulares para expresar secuencias asociadas a CS1 pueden dar como resultado diferentes patrones de glucosilación.

La adición de sitios de glucosilación a polipéptidos CS1 también se puede lograr alterando su secuencia de aminoácidos. La alteración se puede realizar, por ejemplo, mediante adición de, o sustitución por, uno o más

restos de serina o treonina al polipéptido CS1 de secuencia nativa (para sitios de glucosilación enlazados mediante O). La secuencia de aminoácidos de CS1 se puede alterar opcionalmente a través de los cambios en el ADN, particularmente mutando el ADN que codifica el polipéptido CS1 en bases preseleccionadas, de manera que se generan codones que se traducirán en los aminoácidos deseados.

5 Otro medio para incrementar el número de restos de hidratos de carbono en el polipéptido CS1 es mediante acoplamiento químico o enzimático de glucósidos al polipéptido. Véase, por ejemplo, el documento WO 87/05330; p. 259-306 en Aplin y Wriston (1981) CRC Crit. Rev. Biochem.

10 La eliminación de los restos de hidratos de carbono presentes en el polipéptido CS1 se puede lograr de manera química o enzimática, o mediante sustitución mutacional de codones que codifican restos de aminoácidos que sirven como dianas para la glucosilación. Son aplicables técnicas de desglucosilación química. Véanse, por ejemplo, Sojar y Bahl (1987) Arch. Biochem. Biophys. 259: 52-57 y Edge, *et al.* (1981) Anal. Biochem. 118:131-137. La escisión enzimática de restos de hidratos de carbono en los polipéptidos se puede lograr mediante el uso de un variedad de endo- y exoglucosidasas. Véase, por ejemplo, Thotakura, *et al.* (1987) Meth. Enzymol. 138:350-359.

Otro tipo de modificación covalente de los polipéptidos CS1 comprende enlazar el polipéptido CS1 a uno de una variedad de polímeros no proteínicos, por ejemplo, polietilenglicol, polipropilenglicol, o polioxialquilenos, de la manera expuesta en las patentes U.S. n^{os} 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192, o 4.179.337.

Los polipéptidos CS1 también se pueden modificar de una manera para formar moléculas quiméricas que comprenden un polipéptido CS1 fusionado a otra secuencia polipeptídica o de aminoácidos heteróloga. En un ejemplo, tal molécula quimérica comprende una fusión de un polipéptido CS1 con un polipéptido de etiqueta que proporciona un epítipo, al que se puede unir selectivamente un anticuerpo anti-etiqueta. La etiqueta del epítipo se coloca generalmente en el término amino o carboxilo del polipéptido CS1. La presencia de tales formas etiquetadas en el epítipo de un polipéptido CS1 se puede detectar usando un anticuerpo frente al polipéptido de etiqueta. También, la provisión de la etiqueta del epítipo permite que el polipéptido CS1 se purifique fácilmente mediante purificación por afinidad, usando un anticuerpo anti-etiqueta, u otro tipo de matriz de afinidad que se une a la etiqueta del epítipo. Como alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de un polipéptido CS1 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica, tal fusión podría ser la región Fc de una molécula de IgG.

Existen varios polipéptidos de etiqueta y sus anticuerpos respectivos. Los ejemplos incluyen las etiquetas de polihistidina (poli-his) o de poli-histidina-glicina (poli-his-gly); marcadores de quelación metálica y HIS6, el polipéptido de etiqueta de HA de la gripe, y su anticuerpo 12CA5 (Field, *et al.* (1988) Mol. Cell Biol. 8:2159-2165); la etiqueta de c-myc y los anticuerpos 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7, y 9E10 para ella (Evan, *et al.* (1985) Molecular and Cellular Biology 5:3610-3616); y la etiqueta de la glucoproteína D (gD) del virus del herpes simple y su anticuerpo (Paborsky, *et al.* (1990) Protein Engineering 3(6):547-553). Otros polipéptidos de etiqueta incluyen el péptido Flag (Hopp, *et al.* (1988) BioTechnology 6:1204-1210); el péptido del epítipo KT3 (Martin, *et al.* (1992) Science 255:192-194); el péptido del epítipo de tubulina (Skinner, *et al.* (1991) J. Biol. Chem. 266:15163-15166); y la etiqueta del péptido de la proteína del gen 10 de T7 (Lutz-Freyermuth, *et al.* (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6393-6397).

45 También se incluyen proteínas CS1 procedentes de otros organismos, que se clonan y expresan como se explica más abajo. De este modo, se pueden usar secuencias de sondas o secuencias de cebadores de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) degeneradas para encontrar otras proteínas CS1 relacionadas procedentes de seres humanos u otros organismos. Las secuencias sonda y/o cebadoras de PCR particularmente útiles incluyen las áreas únicas de la secuencia de ácido nucleico CS1. Los cebadores de PCR preferidos tienen una longitud de alrededor de 15-35 nucleótidos, siendo preferido alrededor de 20-30, y pueden contener inosina según sea necesario. Las condiciones para la reacción de PCR se han descrito bien (por ejemplo, Innis, PCR Protocols, más arriba).

Además, se pueden obtener proteínas CS1 que son más largas que aquellas codificadas por los ácidos nucleicos de la Tabla 2, por ejemplo mediante la elucidación de secuencias extendidas, la adición de etiquetas epitópicas o de purificación, la adición de otras secuencias, etc.

Las proteínas CS1 también se pueden identificar como codificadas por ácidos nucleicos de CS1. De este modo, las proteínas CS1 son codificadas por ácidos nucleicos que se hibridarán a las secuencias de los listados de secuencias, o sus complementos, como se esquematizan aquí.

Parejas de unión a proteínas CS1

Anticuerpos anti-CS1

65 Los anticuerpos anti-CS1 de la invención se unen específicamente a proteínas CS1. Mediante "unen

específicamente” se quiere decir aquí que los anticuerpos se unen a la proteína con una K_d de al menos alrededor de 0,1 mM, más habitualmente al menos alrededor de 1 μ M preferentemente al menos alrededor de 0,1 μ M o mejor, y lo más preferible 0,01 μ M o mejor. También, a menudo es importante la selectividad de la unión a la diana específica y no las secuencias relacionadas.

5 En una forma de realización, cuando la proteína CS1 se va a usar para generar parejas de unión, por ejemplo anticuerpos para inmunodiagnóstico, la proteína CS1 debería compartir al menos un epítipo o determinante con la proteína de longitud completa. Por “epítipo” o “determinante” se quiere decir aquí típicamente una porción de una proteína que generará y/o se unirá a un anticuerpo o receptor de células T en el contexto de MHC. De ese modo, en la mayoría de los casos, los anticuerpos obtenidos para una proteína CS1 más pequeña serán capaces de unirse a los epítopos particularmente lineales de la proteína de longitud completa. En otra forma de realización, el epítipo es único; esto es, los anticuerpos generados para un único epítipo muestran poca o ninguna reactividad cruzada. En aún otra forma de realización, el epítipo se selecciona de una secuencia proteica expuesta en la tabla.

15 Existen métodos para preparar anticuerpos policlonales (por ejemplo, Coligan, más arriba; y Harlow y Lane, más arriba). Los anticuerpos policlonales se pueden producir en un mamífero, por ejemplo mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectarán en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. El agente inmunizante puede incluir una proteína codificada por un ácido nucleico de la Tabla 2 o su fragmento, o su proteína de fusión. También puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunógena en el mamífero que está siendo inmunizado. Los ejemplos de tales proteínas inmunógenas incluyen, pero no se limitan a, hemocianina, lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de haba de soja. Los ejemplos de adyuvantes que se pueden emplear incluyen adyuvante completo de Freund y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético). Se pueden usar diversos protocolos de inmunización.

30 Como alternativa, los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando métodos de hibridomas, tales como los descritos por Kohler y Milstein (1975) Nature 256:495. En un método de hibridoma, típicamente se inmuniza un ratón, hámster, u otro animal hospedante apropiado con un agente inmunizante para provocar linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente al agente inmunizante. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar in vitro. El agente inmunizante incluirá típicamente un polipéptido codificado por un ácido nucleico de la tabla, o su fragmento, o su proteína de fusión. Generalmente, se usan linfocitos de sangre periférica (“PBL”) si se desean células de origen humano, o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamíferos no humanos. Los linfocitos se fusionan entonces con una estirpe celular inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol para formar una célula de hibridoma (por ejemplo, p.59-103 in Goding (1986) Monoclonal Antibodies: Principles and Practice Academic Press). Las estirpes celulares inmortalizadas se transforman habitualmente en células de mamíferos, particularmente células de origen humano o de roedores, o bovinos. Habitualmente, se emplean estirpes celulares de rata o de ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado, que contiene preferentemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o supervivencia de las células inmortalizadas no fusionadas. Por ejemplo, si las células progenitoras carecen de la enzima hipoxantina, guanina, fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina, y timidina (“medio HAT”) sustancia las cuales evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

50 En una forma de realización, los anticuerpos son anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos monoclonales, preferentemente humanos o humanizados, que tienen especificidades de unión por al menos dos antígenos diferentes, o que tienen especificidades de unión por dos epítopos en el mismo antígeno. Una de las especificidades de unión es para una proteína codificada por un ácido nucleico de la Tabla 1 o su fragmento, y la otra es para otro antígeno, y preferentemente para una proteína o receptor o subunidad de receptor de la superficie celular, preferentemente una que es específica para CS1. Como alternativa, la tecnología de tipo tetrámeros puede crear reactivos multivalentes.

55 En otra forma de realización, los anticuerpos tienen bajos niveles o carecen de fucosa. Los anticuerpos que carecen de fucosa se han correlacionado con actividad de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) potenciada, especialmente a dosis bajas de anticuerpo. Shields, R.L., *et al.*, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Shinkawa, T. *et al.*, (2003), J. Biol. Chem. 278:3466. Los métodos para preparar anticuerpos con menor cantidad de fucosa incluyen el crecimiento en células de mieloma de rata YB2/0 (ATCC CRL 1662). Las células YB2/0 expresan niveles bajos de ARNm de FUT8, que codifica una enzima (α 1,6-fucosiltransferasa) necesaria para la fucosilación de polipéptidos.

65 Los métodos alternativos para incrementar la actividad de ADCC incluyen mutaciones en la porción Fc de un anticuerpo anti-CS1, particularmente mutaciones que incrementan la afinidad del anticuerpo por un receptor Fc γ R. Se ha demostrado una correlación entre la unión incrementada de Fc γ R con Fc mutado, usando ensayos a base de células de fitotoxicidad seleccionada. Shields, R.L. *et al.* (2001) J. Biol. Chem 276:6591-6604; Presta

et al. (2002), *Biochem Soc. Trans.* 30:487-490. Los métodos para incrementar la actividad de ADCC mediante mutaciones específicas de la región Fc incluyen las variantes de Fc que comprenden al menos una sustitución de aminoácido en una posición seleccionada del grupo que consiste en: 234, 235, 239, 240, 241, 243, 244, 245, 247, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 269, 296, 297, 298, 299, 313, 325, 327, 328, 329, 330 y 332, en el que la numeración de los restos en la región de Fc es aquella del índice EU como en Kabat. En una forma de realización preferida, dichas variantes de Fc comprenden al menos una sustitución seleccionada del grupo que consiste en L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239D, S239E, S239N, S239Q, S239F, S239T, S239H, S239Y, V240I, V240A, V240T, V240M, F241W, F241L, F241Y, F241E, F241R, F243W, F243L, F243Y, F243R, F243Q, P244H, P245A, P247V, P247G, V262I, V262A, V262T, V262E, V263I, V263A, V263T, V263M, V264L, V264I, V264W, V264T, V264R, V264F, V264M, V264Y, V264E, D265G, D265N, D265Q, D265Y, D265F, D265V, D265I, D265L, D265H, D265T, V266I, V266A, V266T, V266M, S267Q, S267L, E269H, E269Y, E269F, E269R, Y296E, Y296Q, Y296D, Y296N, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, Y296H, N297S, N297D, N297E, A298H, T299I, T299L, T299A, T299S, T299V, T299H, T299F, T299E, W313F, N325Q, N325L, N325I, N325R, N325A, N325E, N325A, N325T, N325V, N325H, A327N, A327L, L328M, L328D, L328E, L328N, L328Q, L328F, L328I, L328V, L328T, L328H, L328A, P329F, A330L, A330Y, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, I332D, I332E, I332N, I332Q, I332T, I332H, I332Y y I332A, en las que la numeración de los restos en la región de Fc es aquella del índice EU como en Kabat. Las variantes de Fc también se pueden seleccionar del grupo que consiste en V264L, V264I, F241 W, F241L, F243W, F243L, F241L/F243L/V262I/V264I, F241W/F243W, F241W/F243W/V262A/V264A, F241L/V262I, F243L/V264I, F243L/V262I/V264W, F241Y/F243Y/V262T/V264T, F241E/F243R/V262E/V264R, F241E/F243Q/V262T/V264E, F241R/F243Q/V262T/V264R, F241E/F243Y/V262T/V264R, L328M, L328E, L328F, I332E, L3238M/I332E, P244H, P245A, P247V, W313F, P244H/P245A/P247V, P247G, V264I/I332E, F241E/F243R/V262E/V264R/I332E, F241E/F243Q/V262T/V264E/I332E, F241R/F243Q/V262T/V264R/I332E, F241E/F243Y/V262T/V264R/I332E, S298A/I332E, S239E/I332E, S239Q/I332E, S239E, D265G, D265N, S239E/D265G, S239E/D265N, S239E/D265Q, Y296E, Y296Q, T299I, A327N, S267Q/A327S, S267L/A327S, A327L, P329F, A330L, A330Y, I332D, N297S, N297D, N297S/I332E, N297D/I332E, N297B/I332E, D265Y/N297D/I332E, D265Y/N297D/T299L/I332B, D265F/N297P/I332E, L328I/I332B, L328Q/I332B, I332N, I332Q, V264T, V264F, V240I, V263I, V266I, T299A, T299S, T299V, N325Q, N325L, N325, S239D, S239N, S239F, S239D/I332D, S239D/I332E, S239D/I332N, S239D/I332Q, S239E/I332D, S239E/I332N, S239E/I332Q, S239N/I332D, S239N/I332E, S239N/I332N, S239N/I332Q, S239Q/I332D, S239Q/I332N, S239Q/I332Q, Y296D, Y296N, F241Y/F243Y/V262T/V264T/N297D/I332E, A330Y/I332E, V264I/A330Y/I332B, A330L/I332E, V264I/A330L/I332E, L234D, L234E, L234N, L234Q, L234T, L234H, L234Y, L234I, L234V, L234F, L235D, L235S, L235N, L235Q, L235T, L235H, L235Y, L235I, L235V, L235F, S239T, S239H, S239Y, V240A, V240T, V240M, V263A, V263T, V263M, V264M, V264Y, V266A, V266T, V266M, E269H, E269Y, E269F, B269R, Y296S, Y296T, Y296L, Y296I, A298H, T299H, A330V, A330I, A330F, A330R, A330H, N325D, N325B, N325A, N325T, N325V, N325H, L328D/I332E, L328E/I332E, L328N/I332B, L328Q/I332E, L328V/I332E, L328T/I332E, L328H/I332E, L328I/I332E, L328A, I332T, I332H, I332Y, I332A, S239E/V264I/I332E, S239Q/V264I/I332E, S239E/V264I/A330Y/I332E, S239E/V264I/S298A/A330Y/I332E, S239D/N297D/I332B, S239E/N297D/I332E, S239D/D265V/N297D/I332E, S239D/D265I/N297D/I332E, S239D/D265L/N297D/I332E, S239D/D265F/N297D/I332E, S239D/D265Y/N297D/I332E, S239D/D265H/N297D/I332E, S239D/D265T/N297D/I332E, V264B/N297D/I332E, Y296D/N297D/I332E, Y296B/N297D/I332E, Y296N/N297D/I332E, Y296Q/N297D/I332E, Y296H/N297D/I332E, Y296T/N297D/I332E, N297D/T299V/I332E, N297D/T299I/I332B, N297D/T299L/I332E, N297D/T299F/I332E, N297D/T299H/I332E, N297D/T299E/I332E, N297D/T299E/I332E, N297D/A330Y/I332E, N297D/S298A/A330Y/I332B, S239D/A330Y/I332E, S239N/A330Y/I332E, S239D/A330L/I332E, S239N/A330L/I332E, V264I/S298A/I332E, S239D/S298A/I332E, S239N/S298A/I332B, S239D/V264V/I332E, S239D/V264I/S298A/I332E, y S239D/264I/A330L/I332E, en las que la numeración de los restos en la región de Fc es aquella del índice EU como en Kabat. Véase también el documento PCT WO 2004/029207, 8 de abril del 2004.

50 La actividad de ADCC asociada a anticuerpos se puede monitorizar y cuantificar mediante la medida de la liberación en el sobrenadante de lactato dehidrogenasa (LDH), que es liberada rápidamente con el daño a la membrana plasmática.

55 Otras formas de realización alternativas para promover la citotoxicidad de las células con tratamiento de anticuerpos incluyen la estimulación de cascada de señalización mediada por anticuerpos, que da como resultado la muerte celular para la célula unida al anticuerpo. Además, la estimulación mediada por anticuerpos del sistema inmunitario innato (por ejemplo, a través de células NK) también puede dar como resultado la muerte de células tumorales o de células infectadas víricamente.

60 Detección de secuencia de CS1 para aplicaciones de diagnóstico

65 Los niveles de expresión de ARN de los genes se pueden determinar para diferentes estados celulares en el trastorno autoinmunitario o fenotipo canceroso, por ejemplo mieloma. Para proporcionar perfiles de expresión, se evalúan los niveles de expresión de genes en tejido normal (por ejemplo, que no sufre un trastorno) y en tejido enfermo (y, en algunos casos, para gravedades variables de trastornos que se refieren al pronóstico como se explica más abajo). Un perfil de expresión génica de un estado celular particular o punto de desarrollo es

esencialmente una "huella dactilar" del estado de la célula. Aunque dos estados pueden tener un gen particular expresado de forma similar, la evaluación de un número de genes simultáneamente permite la generación de un perfil de expresión génica que refleja el estado de la célula. Comparando los perfiles de expresión de las células en estados diferentes, se obtiene la información relativa a qué genes son importantes (incluyendo tanto el aumento como la disminución de genes) en cada uno de estos estados. Después, el diagnóstico se puede realizar o confirmar para determinar si una muestra de tejido tiene el perfil de expresión génica de tejido normal o enfermo. Esto proporcionará un diagnóstico molecular de las afecciones relacionadas.

"Expresión diferencial", o equivalentes gramaticales como se usan aquí, se refiere a la diferencia cualitativa o cuantitativa en los patrones de expresión génica temporal y/ celular dentro y entre las células y tejido. De este modo, un gen expresado diferencialmente puede tener cualitativamente su expresión alterada, incluyendo una activación o inactivación en, por ejemplo, tejido normal frente a enfermo. Los genes se pueden encender o apagar en un estado particular, con relación a otro estado permitiendo así la comparación de dos o más estados. Un gen regulado cualitativamente mostrará un patrón de expresión en un estado o tipo celular que es detectable mediante técnicas estándar. Algunos genes se expresarán en un estado o tipo celular, pero no en ambos. Como alternativa, la diferencia en la expresión puede ser cuantitativa, por ejemplo por cuanto a la expresión se incrementa o se disminuye; por ejemplo, la expresión génica se aumenta, dando como resultado una cantidad incrementada de transcrito, o se disminuye, dando como resultado una cantidad reducida de transcrito. El grado en el que la expresión difiere necesita ser solo suficientemente grande para cuantificar vía técnicas de caracterización estándar como se esquematiza más abajo, tal como mediante el uso de chips de expresión Affymetrix GENECHIP® (microchip de ADN). Véase Lockhart (1996) Nature Biotechnology 14:1675-1680. Otras técnicas incluyen, pero no se limitan a, PCR de transcriptasa inversa cuantitativa, análisis northern, protección mediante RNasa. Como se explica anteriormente, preferentemente el cambio en la expresión (por ejemplo, aumento o disminución) es al menos alrededor del 50%, más preferentemente al menos al rededor del 100%, más preferentemente al menos alrededor de 150%, más preferentemente al menos alrededor del 200%, siendo especialmente preferido de 300 a al menos 1000%.

La evaluación puede ser al nivel de transcritogénico o al nivel proteico. La cantidad de expresión génica se puede monitorizar usando sondas de ácido nucleico para el equivalente de ARN o ADN del transcritogénico, y la cuantificación de los niveles de expresión génica o, como alternativa, el propio producto génico final (proteína) se puede monitorizar, por ejemplo, con anticuerpos contra la proteína CS1 e inmunoensayos estándar (ELISA, etc.) u otras técnicas, incluyendo ensayos de espectroscopía de masas, ensayos electroforesis en gel bidimensional, etc. Las proteínas que corresponden a CS1, por ejemplo aquellas identificadas como importantes en un fenotipo de enfermedad, se pueden evaluar en un ensayo de diagnóstico de la enfermedad. En otro caso, la monitorización de la expresión génica se lleva a cabo simultáneamente en un número de genes. Igualmente se puede llevar a cabo la monitorización múltiple de la expresión proteica.

Las sondas de ácido nucleico de CS1 se pueden unir a biochips como se explica aquí para la detección y cuantificación de secuencias de CS1 en una célula particular. Los ensayos se describen posteriormente más abajo en el ejemplo. Para proporcionar mayor sensibilidad, se pueden usar técnicas de PCR.

Los ácidos nucleicos que codifican CS12 se pueden detectar, Aunque se puede detectar el ADN o ARN que codifica la proteína CS1, son de particular interés los métodos en los que se detecta un ARNn que codifica una proteína CS1. Las sondas para detectar ARNn pueden ser una sonda nucleotídica/dexosinucleotídica que es complementaria a y se hibrida con el ARNn, e incluye, pero no se limita a, oligonucleótidos, ADNc, o ARN. Las sondas deberían contener también un marcador detectable, como se define aquí. En un método, el ARNn se detecta después de inmovilizar el ácido nucleico a examinar sobre un soporte sólido, tal como membranas de nylon, e hibridando la sonda con la muestra. Tras el lavado para eliminar la sonda unida de forma no específica, se detecta el marcador. En otro método, la detección del ARNn se lleva a cabo in situ. En este método, las células permeabilizadas o las muestras de tejido se ponen en contacto con una sonda de ácido nucleico marcada de forma detectable durante un tiempo suficiente para permitir que la sonda se hibride con el ARNn diana. Tras el lavado para eliminar la sonda de unión no específica, se detecta el marcador. Por ejemplo, una ribosonda (sonda de ARN) marcada con digoxigenina, que es complementaria al ARNn que codifica una proteína de mieloma, se detecta uniendo la digoxigenina con un anticuerpo secundario anti-digoxigenina y desarrollando con nitro azul de tetrazolio y fosfato de 5-bromo-4-cloro-3-indóilo.

En los ensayos de diagnóstico se usan diversas proteínas procedentes de las tres clases de proteínas como se describen aquí (proteínas segregadas, transmembránicas, o intracelulares). En los ensayos de diagnóstico se usan las proteínas CS1, anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas, y células que contienen secuencias de CS1. Esto se puede llevar a cabo en un gen individual, o a nivel polipeptídico correspondiente. Los perfiles de expresión se pueden usar, preferentemente en conjunción con técnicas de identificación de alto rendimiento, para permitir la monitorización de los genes de los perfiles de expresión y/o los polipéptidos correspondientes.

Como se describe y define aquí, la proteína CS1 encuentra uso como un marcador de enfermedad de las enfermedades autoinmunitarias, tales como SLE, RA, y LED y afecciones cancerosas, tales como mieloma y

leucemia de células plasmáticas. Adicionalmente, CS1 encuentra uso como un marcador con fines de pronóstico o de diagnóstico. La detección de estas proteínas en tejido enfermo putativo permite la detección, pronóstico, o diagnóstico de tales afecciones, y la selección de la estrategia terapéutica. En una forma de realización, los anticuerpos se usan para detectar CS1. Un método preferido separa proteínas de una muestra mediante electroforesis en un gel (típicamente un gel proteico desnaturalizante y reductor, pero puede ser otro tipo de gel, incluyendo geles de enfoque isoelectrico y similares). Tras la separación de las proteínas, se detecta CS1, por ejemplo mediante inmunotransferencia con anticuerpos provocados frente a CS1.

En otro método, los anticuerpos para CS1 encuentran uso en técnicas de formación de imágenes in situ, por ejemplo en histología. Véase, por ejemplo, Asai, *et al.* (eds. 1993) *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology* (vol. 37) Academic Press. En este método, las células se ponen en contacto con uno a muchos anticuerpos para la proteína o proteínas de mieloma. Tras el lavado para eliminar la unión no específica del anticuerpo, se detecta la presencia del anticuerpo o de los anticuerpos. El anticuerpo se puede detectar incubando con un anticuerpo secundario que contiene un marcador detectable. En otro método, el anticuerpo primario para CS1 contiene un marcador detectable, por ejemplo, un marcador enzimático que puede actuar sobre un sustrato. En otro método, cada uno de los múltiples anticuerpos primarios contiene un marcador distinto y detectable. Este método encuentra uso particular en la identificación simultánea de CS1 junto con otros marcadores de las afecciones mencionadas anteriormente. También se proporcionan aquí muchas otras técnicas de formación de imágenes histológicas.

El marcador se puede detectar en un fluorómetro, que tiene la capacidad para detectar y distinguir emisiones de diferentes longitudes de onda. Además, en el método se puede usar un clasificador de células activado por fluorescencia (FACS).

En otra forma de realización, los anticuerpos encuentran uso en el diagnóstico de trastornos autoinmunitarios, tales como SLE, RA, y IBD, y cáncer, tal como mieloma y leucemia de células plasmáticas, procedentes de sangre, suero, plasma, heces y otras muestras. Por lo tanto, tales muestras son útiles como muestras a sondear o ensayar para determinar la presencia de CS1. Los anticuerpos se pueden usar para detectar CS1 mediante técnicas de inmunoensayo descritas previamente, incluyendo ELISA, inmunotransferencia (transferencia Western), inmunoprecipitación, tecnología BIACORE, y similar. Por el contrario, la presencia de anticuerpos puede indicar una respuesta inmunitaria frente a una proteína CS1 endógena.

En otro método, se lleva a cabo la hibridación in situ de sondas de ácidos nucleicos de CS1 marcadas para conjuntos de tejidos. Por ejemplo, se obtienen conjuntos de muestras de tejido, incluyendo tejido enfermo y/o tejido normal. Después se lleva a cabo la hibridación in situ (véase, por ejemplo, Ausubel, más arriba). Cuando se comparan las huellas dactilares entre un individuo y un patrón, el diagnóstico, el pronóstico, o la predicción se pueden basar en los hallazgos. Se entiende además que los genes que indican el diagnóstico pueden diferir de aquellos que indican el pronóstico, y el perfil molecular de la condición de las células puede conducir a distinciones entre afecciones sensibles o refractarias, o puede ser predictivo de resultados.

En una forma de realización, los anticuerpos anti-CS1 se usan en ensayos de pronóstico. Como antes, se pueden generar perfiles de expresión génica para que se correlacionen con un estado mórbido, información clínica, patológica, u otra información, en términos de pronóstico a largo plazo. Nuevamente, esto se puede realizar a nivel proteico o génico, prefiriéndose el uso de genes. Pueden ser útiles genes individuales o múltiples en diversas combinaciones. Como antes, las sondas de CS1 se pueden unir a biochips para la detección y cuantificación de secuencias de CS1 en un tejido o paciente. Los ensayos transcurren como se explica anteriormente para el diagnóstico. El método de la PCR puede proporcionar una cuantificación más sensible y exacta.

Los genes útiles en ensayos de pronóstico son genes que se expresan diferencialmente según la etapa de enfermedad del paciente. En un método, los genes se pueden expresar de forma única según la etapa del paciente. En otro método, los genes se pueden expresar a niveles diferenciales según la etapa del paciente. Por ejemplo, en mieloma, los pacientes se ajustan a tres etapas diferentes según el grado y localización de la enfermedad: etapas I, II y III. En la Etapa I, los síntomas son leves a no existentes, no mostrando muchos pacientes síntomas de mieloma. Un diagnóstico positivo es la presencia de células tumorales; sin embargo, el número de glóbulos rojos es normal o está ligeramente por debajo del intervalo normal, no hay ningún incremento detectable de calcio en la sangre, hay niveles muy bajos de proteína M en la sangre u orina, y no se puede observar daño óseo detectable en rayos X. En la Etapa II, las células cancerígenas son prevalentes en mayores números. La función renal puede verse afectada, lo que empeora el diagnóstico del pronóstico para la mayoría de los pacientes. La Etapa III, provoca anemia, hipercalcemia, daño óseo avanzado, y niveles elevados de proteína M en la sangre u orina. La correlación de la expresión proteica con las diferentes etapas en el trastorno autoinmunitario podría también demostrar ser útil para determinar el pronóstico de tales trastornos. La correlación de genes expresados en las diferentes etapas, ya sea expresados de forma única o que tengan niveles de expresión diferenciales según la etapa, se puede usar para determinar la viabilidad de la inducción de la remisión en un paciente. Esto sería especialmente útil en las etapas tempranas de la enfermedad, en las que los pacientes con mieloma muestran poco síntomas. Además, también pueden ser útiles como herramienta de

pronóstico los genes que se expresan indicando comienzo de complicaciones a largo plazo, tales como beta-2 microglobulina (un indicador del daño renal), así como niveles elevados de seroalbúmina y lactato deshidrogenasa.

5 La correlación de genes expresados en diferentes etapas, ya sea expresados de forma única o que tengan niveles de expresión diferenciales según la etapa, también se puede monitorizar para determinar la eficacia del tratamiento usando los compuestos terapéuticos descritos en la presente invención. Por ejemplo, los pacientes tratados con antagonistas de la presente invención se pueden monitorizar para determinar la eficacia terapéutica de dichos antagonistas a través de la monitorización de marcadores, incluyendo, por ejemplo, CS1 o CS1 en combinación con marcadores específicos del trastorno (por ejemplo, la monitorización de la proteína M para el tratamiento de mieloma. La monitorización de estos marcadores específicos será importante a la hora de determinar la eficacia de la invención terapéutica, así como para determinar las consideraciones de la dosis y del método de tratamiento para las diferentes indicaciones de la presente invención.

15 Inducción de trastornos mórbidos como sistemas de modelo in vivo

Enfermedad inflamatoria del intestino

20 Se han desarrollado modelos experimentales in vivo para la investigación de procesos patológicos de enfermedad inflamatoria del intestino. Sartor RB, Aliment. Pharmacol. Ther. 11:89-96 (1997). Por ejemplo, se han obtenido ratones transgénicos a los que se les ha eliminado un gen, en los que se interrumpió el gen de la enfermedad inflamatoria del intestino, o en los que se insertó un gen de la enfermedad inflamatoria del intestino. Los ratones transgénicos a los que se les eliminan genes se pueden obtener mediante inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio del gen de la enfermedad inflamatoria del intestino endógeno, en el genoma del ratón, vía recombinación homóloga. Tales ratones también se pueden obtener sustituyendo el gen endógeno de la enfermedad inflamatoria del intestino por una versión mutada del gen de la enfermedad inflamatoria del intestino, o mutando el gen endógeno de la enfermedad inflamatoria del intestino, por ejemplo mediante exposición a carcinógenos.

30 Se introduce un constructo de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética recientemente manipulada por ingeniería se inyectan en un embrión de ratón hospedante, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la estirpe celular mutante. Por lo tanto, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contenga la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi, *et al.* (1989) Science 244:1288-1292). Los ratones quiméricos seleccionados como dianas se pueden derivar según Hogan, *et al.* (1988) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual CSH Press; y Robertson (ed. 1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach IRL Press, Washington, D.C.

40 Se pueden construir otros modelos usando manipulación no genética de modelos de animales. En particular, se ha usado ampliamente un modelo en la identificación de pequeñas moléculas. Este modelo induce colitis en ratas o ratones mediante una exposición única intracolónica a una disolución de hapteno ácido 2,4,-trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Morris GP *et al.*, Gastroenterology 96: 795-803 (1989); Boughton-Smith NK, Br. J. Pharmacol. 94:65-72 (1988). El tratamiento con TNBS produce una respuesta inflamatoria local intensa que alcanza su nadir después de 2 a 3 días, y puede durar hasta 21 días, dependiendo de la importancia de la exposición.

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

55 El modelo se ha usado para estudiar y validar la inflamación colónica, y señala aspectos de la enfermedad inflamatoria del intestino. Hoffman P *et al.*, Gut 41:195-202 (1997); Jacobson K, McHugh K, Collins SM, Gastroenterology 112: 156-62 (1997).

60 Otros modelos de animales incluyen ratas transgénicas HLA-B27 (Hammer RE *et al.*, Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and Human b2M: An animal model of HLA-B27 associated human disorders, Cell 63:1088-1112 (1990)), ratones transgénicos deficientes en IL-2 (Baumgart DC *et al.*, Mechanisms of intestinal epithelial cell injury and colitis in interleukin 2 deficient mice, Cell Immunol. 187:52-66 (1998)), ratones deficientes en mdrla (Panwala CM *et al.*, A Novel Model of Inflammatory Bowel Disease: Mice deficient for the multiple drug resistance gene, mdrla, spontaneously develop colitis, J. Immunol. 161:5733-44 (1998)), y ratones deficientes en IL 10 (Freeman HJ, Studies on the interleukin-10 gene in animal models of

colitis, *Canadian Gastroenterology* (2003)).

Mieloma

5 Se han desarrollado modelos experimentales *in vivo* para la investigación de procesos patológicos de mieloma. Sartor RB, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 11:89-96 (1997). Por ejemplo, se han obtenido ratones transgénicos a los que se les suprimen genes, en los que se interrumpe el gen de mieloma, o en los que se inserta un gen de mieloma. Los ratones transgénicos a los que se les suprimen genes se pueden obtener mediante inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio del gen de mieloma endógeno, en el genoma del ratón, vía recombina-
10 ción homóloga. Tales ratones también se pueden obtener sustituyendo el gen endógeno de mieloma con una versión mutada del gen de mieloma, o mutando el gen endógeno de mieloma, por ejemplo mediante exposición a carcinógenos.

15 Se introduce un constructo de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Las células que contienen la lesión genética recientemente manipulada por ingeniería se inyectan en un embrión de ratón hospedante, que se reimplanta en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan en ratones quiméricos que poseen células germinales parcialmente derivadas de la estirpe celular mutante. Por lo tanto, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contenga la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi, *et al.* (1989) *Science* 244:1288-1292). Los ratones quiméricos seleccionados como dianas se pueden derivar según Hogan, *et al.* (1988) *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* CSH Press; y Robertson (ed. 1987) *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* IRL Press, Washington, D.C.

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

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

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

Métodos terapéuticos

50 *Tratamiento de la enfermedad autoinmunitaria*

Un método para reducir la proliferación, adhesión, diferenciación, activación y/o coactivación de leucocitos comprende poner en contacto los leucocitos con un antagonista de CS1 descrito aquí.

55 Un método para reducir la secreción (o producción) de inmunoglobulina por linfocitos (tales como células B) comprende poner en contacto los linfocitos con un antagonista de CS1 descrito aquí. Los antagonistas de la presente invención pueden reducir la producción de inmunoglobulina (tales como IgM, IgG, IgD, IgA, e IgE) en al menos 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, o 50%. El porcentaje de cambio se calcula restando la concentración de inmunoglobulina antes de la administración de la primera dosis del anticuerpo (día 0) de la concentración de inmunoglobulina después de la dosis (día x), dividiendo entre la concentración de inmunoglobulina antes de la primera dosis (día 0), y multiplicando por 100, por ejemplo [(día x - día 0)/día 0] X 100.

65 Un método para inducir apoptosis o citolisis de células que expresan CS1 comprende poner en contacto las células con un anticuerpo dirigido contra CS1 descrito aquí. Preferentemente, la inducción se logra vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En general, los anticuerpos de la presente invención se unen a antígenos en la superficie de células diana (células que expresan CS1) en presencia de células efectoras

(tales como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc indica a las células efectoras que tiene que exterminar las células diana mediante citolisis o apoptosis. La citolisis se puede detectar vía detección de la liberación del marcador o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o vía la detección de la viabilidad reducida de las células diana (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos para determinar la apoptosis se pueden llevar a cabo mediante un ensayo de marcado del extremo de muesca con digoxigenina-11-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNEL) (Lazebnik *et al.*, Nature: 371, 346 (1994). La citotoxicidad se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tales como el kit Cytotoxicity Detection Kit de Roche Applied Science (Indianapolis, IN). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención inducen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, u 80% de citotoxicidad de las células diana. El porcentaje se calcula mediante los métodos descritos en los Ejemplo.

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

En una forma de realización preferida, los leucocitos son a) linfocitos activados, tales como células B y/o células T, preferentemente células B CD19⁺ y/o células T CD3⁺; b) células CD14⁺ activadas y/o sin tratamiento previo; c) células dendríticas activadas y/o no activadas; y/o c) células CD56⁺ NK y/o NKT.

Un método para reducir la secreción de inmunoglobulina por las células B, en un sujeto que lo necesita, comprende administrar una cantidad efectiva de un antagonista de CS1 en dicho sujeto.

Un método para inducir citotoxicidad, citolisis, y/o apoptosis de células que expresan CS1 en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo anti-CS1 a dicho sujeto.

Los antagonistas, preferentemente anticuerpos de la presente invención, se pueden usar para la prevención o tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, incluyendo, pero sin limitarse a, enfermedad de Addison, enfermedades autoinmunitarias del oído, enfermedades autoinmunitarias del ojo, tales como uveítis, hepatitis autoinmunitaria, enfermedad de Crohn, diabetes (tipo I), epididimitis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Hashimoto, anemia hemolítica, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, miastenia grave, pénfigo vulgar, psoriasis, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, psoriasis, síndrome de Sjogren, espondiloartropatías, tiroiditis, colitis ulcerosa y/o vasculitis.

En una forma de realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria que se puede prevenir y/o tratar con la presente invención es SLE, RA, o IBD. Después de ser administrados a un sujeto que ha desarrollado los síntomas de SLE, RA, o IBD, los anticuerpos anti-CS1 deberían ser capaces de reducir la gravedad de los síntomas. Como alternativa, los anticuerpos anti-CS1 se pueden administrar a un sujeto antes de que el sujeto desarrolle cualesquiera manifestaciones clínicas de SLE, RA, o IBD. Tal administración preventiva de los anticuerpos debería prevenir completamente que el sujeto desarrolle cualquiera de los síntomas de SLE, RA, o IBD, o al menos prevenir que el sujeto desarrolle síntomas graves como en la afección sin el tratamiento con anticuerpos. La gravedad de los síntomas de SLE, RA, o IBD se puede medir mediante el ensayo clínico estándar para SLE, RA, o IBD conocido en la técnica, tal como el nivel sérico de anticuerpos anti-ADN, proteinuria, y la tasa de mortalidad de los pacientes.

Habitualmente se aplican métodos terapéuticos a pacientes humanos, pero se pueden aplicar a otros mamíferos.

Tratamiento del cáncer

También se incluyen métodos terapéuticos para reducir la proliferación de células de mieloma, que comprenden poner en contacto células de mieloma con un antagonista de una proteína de mieloma, preferentemente un anticuerpo u otro antagonista, tal como los anticuerpos anti-CS1 descritos aquí. Por ejemplo, los anticuerpos pueden hacer contacto con células de mieloma *in vitro* (tal como, añadiendo los antagonistas en un medio de cultivo celular en el que se cultivan las células de mieloma), *ex vivo*, o *in vivo* (por ejemplo, administrando los antagonistas a un sujeto).

Un método para reducir la proliferación de células de mieloma comprende administrar una cantidad efectiva de un antagonista de la proteína de mieloma a dicho sujeto.

En un aspecto, los antagonistas, preferentemente anticuerpos de la presente invención, se pueden usar para la prevención o tratamiento de mieloma. Después de ser administrados a un sujeto que ha desarrollado los síntomas de mieloma, los anticuerpos o antagonista deberían ser capaces de reducir la gravedad de los síntomas. Como alternativa, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar a un sujeto antes de que el sujeto desarrolle cualquier manifestación clínica de mieloma. La gravedad de los síntomas de mieloma se puede medir mediante el ensayo clínico estándar para mieloma conocido en la técnica, tal como análisis de la densidad ósea mediante rayos X, niveles de beta-2-microglobulina, o hipercalcemia. Los métodos terapéuticos

se aplican actualmente a pacientes humanos, pero se pueden aplicar a otros mamíferos.

Un método para inducir apoptosis o citolisis de células que expresan CS1 comprende poner en contacto las células con un anticuerpo anti-CS1 descrito aquí. En un método preferido, la inducción se logra vía citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). En general, los anticuerpos de la presente invención se unen a antígenos sobre la superficie de las células diana (células que expresan CS1) en presencia de células efectoras (tales como células asesinas naturales o macrófagos). Los receptores Fc en las células efectoras reconocen los anticuerpos unidos. La reticulación de los receptores Fc indica a las células efectoras que tienen que exterminar a las células diana mediante citolisis o apoptosis. La citolisis se puede detectar vía la detección de la liberación del marcador o lactato deshidrogenasa de las células lisadas, o la detección de la viabilidad reducida de las células diana (por ejemplo, ensayo de anexina). Los ensayos para determinar la apoptosis se pueden llevar a cabo mediante ensayo del marcado de extremos cortados de digoxigenina-11-dUTP mediado por desoxinucleotidil transferasa terminal (TUNNEL) (Lazebnik *et al.*, Nature: 371, 346 (1994). La citotoxicidad también se puede detectar directamente mediante kits de detección conocidos en la técnica, tales como el kit Cytotoxicity Detection Kit de Roche Applied Science (Indianapolis, IN). Preferentemente, los anticuerpos de la presente invención inducen al menos 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, u 80% de citotoxicidad de las células diana. El porcentaje se calcula mediante los métodos descritos en los Ejemplos.

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

En una forma de realización preferida, los leucocitos son a) linfocitos activados, tales como células B y/o células T, preferentemente células B CD 19⁺ y/o células T CD3⁺; b) células CD14⁺ activadas y/o sin tratamiento previo; c) células dendríticas activadas y/o no activadas; y/o c) células NK y/o NKT CD56⁺.

Un método para reducir la secreción de inmunoglobulina por las células B, en un paciente que lo necesita, comprende administrar una cantidad efectiva de un antagonista de CS1 a dicho sujeto. Tal reducción en la secreción de inmunoglobulina por las células B puede ayudar a aliviar complicaciones de mieloma, incluyendo síndrome de hiperviscosidad.

Un método para inducir citotoxicidad, citolisis, y/o apoptosis de células que expresan CS1 en un sujeto que lo necesita comprende administrar una cantidad efectiva de un anticuerpo de CS1 a dicho sujeto.

35 *Administración de agentes terapéuticos*

Existen diversos métodos para administrar los antagonistas, por ejemplo anticuerpos de la presente invención. Se prefiere la administración parenteral. El anticuerpo se puede administrar intravenosamente a un paciente como un bolo, o mediante infusión continua a lo largo de un período de tiempo; o mediante vías intramusculares, subcutáneas, intraperitoneales, o intracerebroespinales. También se incluyen en la presente invención las vías oral, tópica, por inhalación, u otros medios de suministro conocidos por los expertos en la materia.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden habitualmente una disolución de antagonistas (por ejemplo, anticuerpos), o un cóctel de los mismos, disuelto en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso. Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, por ejemplo agua para inyección (WFI), o agua tamponada con fosfato, citrato, acetato, etc., hasta un pH típicamente de 5,0 a 8,0, muy a menudo 6,0 a 7,0, y/o que contiene sales tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, etc., para hacerlos isotónicos. El vehículo también puede contener excipientes tales como seroalbúmina humana, polisorbato 80, azúcares o aminoácidos, para proteger la proteína activa. La concentración de un antagonista (por ejemplo, anticuerpo) en estas formulaciones varía ampliamente desde alrededor de 0,1 hasta 100 mg/ml, pero a menudo está en el intervalo de 1 a 10 mg/ml. El anticuerpo monoclonal formulado es particularmente adecuado para la administración parenteral, y se puede administrar como una infusión intravenosa o mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa. Se conocen métodos reales para preparar composiciones administrables parenteralmente, o son manifiestos para los expertos en la materia, y se describen con más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (15^a Ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno cualquiera de los anticuerpos descritos aquí.

Las composiciones se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos, que comprenden inhibir las interacciones entre una CS1 y su sustrato celular, inhibir la adhesión de células enfermas, o prevenir y/o reducir los síntomas clínicos de los trastornos anteriores. Una cantidad adecuada para lograr uno cualquiera de estos efectos deseados se define como una "cantidad efectiva". Los anticuerpos se pueden suministrar a un paciente mediante administraciones individuales o múltiples.

Para el fin de tratar una enfermedad, la dosis apropiada de los antagonistas (por ejemplo, anticuerpos) dependerá de la gravedad y curso de la enfermedad, los antecedentes clínicos y respuesta del paciente, la

toxicidad de los anticuerpos, y el buen criterio del médico. Los antagonistas se administran de forma adecuada al paciente de una vez o a lo largo de una serie de tratamientos. La dosis candidata inicial se puede administrar a un paciente. La dosificación apropiada y el régimen de tratamiento se pueden establecer monitorizando el progreso de la terapia usando técnicas convencionales conocidas para la persona experta en la técnica.

5

Adicionalmente, el antagonista (tales como anticuerpos) se puede utilizar solo en forma sustancialmente pura, o junto con agentes terapéuticos para enfermedades autoinmunitarias conocidas por aquellos de pericia en la técnica. Otras terapias que se pueden usar conjuntamente con el tratamiento con los anticuerpos incluyen la administración de moléculas de aminoácido antisentido o compuestos biológicos, tales como anticuerpos terapéuticos adicionales. De este modo, el tratamiento de la presente invención se formula de manera que permite ser administrado en serie o en combinación con otro agente para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias. Para tratar trastornos autoinmunitarios y mieloma, el anticuerpo se administrará a menudo después o en combinación con uno o más fármacos inmunosupresores e inmunomoduladores adicionales.

10

15 Kits para uso en aplicaciones de diagnóstico y/o pronóstico

Para uso en aplicaciones de diagnóstico y de investigación sugeridas anteriormente, también se proporcionan aquí kits. En aplicaciones de diagnóstico y de investigación, tales kits pueden incluir al menos uno de los siguientes: reactivos de ensayo, tampones, ácidos nucleicos o anticuerpos específicos para CS1, sondas y/o cebadores de hibridación, polinucleótidos antisentido, ribozimas, polipéptidos o polinucleótidos CS1 dominantes negativos, inhibidores de tipo pequeña molécula de secuencias asociadas a CS1, etc.

20

Además, los kits pueden incluir materiales de instrucción que contienen instrucciones (por ejemplo, protocolos). Aunque los materiales de instrucción comprenden típicamente materiales escritos o impresos, no están limitados a tales. Se contempla aquí un medio capaz de almacenar tales instrucciones y comunicarlas a un usuario final. Tales medios incluyen, pero no se limitan a, medios de almacenamiento electrónico (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Tales medios pueden incluir direcciones a sitios de internet que proporcionan tales materiales de instrucción.

25

También se proporcionan kits para identificar moduladores de las secuencias asociadas a CS1. Tales kits se pueden preparar a partir de materiales y reactivos fácilmente disponibles. Por ejemplo, tales kits pueden comprender uno o más de los siguientes materiales: un polipéptido o polinucleótido asociado a CS1, tubos de reacción, e instrucciones para ensayar la actividad asociada a CS1. Opcionalmente, el kit contiene proteína CS1 biológicamente activa. Se puede preparar una amplia variedad de kits y componentes, dependiendo del usuario pretendido del kit y las necesidades particulares del usuario. El diagnóstico implicaría típicamente la evaluación de una pluralidad de genes o productos. Los genes se seleccionarán típicamente basándose en correlaciones con parámetros importantes en la enfermedad que se pueden identificar en datos históricos o de resultados.

30

35

40 **Ejemplos**

Ejemplo 1: Aislamiento e identificación de CS1

CS1 se identificó a partir de una librería de sustracción de ADNc de subconjuntos de células B (células B sin tratamiento frente a células B de memoria + plasmáticas) procedentes de sangre periférica de adulto sano normal. CS1 se expresó preferentemente entre las células B de memoria y plasmáticas. Las librerías de sustracción se produjeron siguiendo el protocolo descrito a continuación:

45

Aislamiento de subconjuntos de células B:

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) procedentes de nueve donantes adultos sanos, con gradientes estándar de Ficoll-hypaque. Las células B se aislaron de las PBMC siguiendo un protocolo de selección negativa estándar. Las PBMC se incubaron en un cóctel de anticuerpos de anti-CD2, CD3, CD4, CD14, CD16, CD56, CD66 y glicoforina A humanas de ratón purificados. Tras la incubación y lavado, se añadieron perlas magnéticas Dynal anti-ratón de cabra, a 7-10 perlas por célula. Subsiguientemente, las células unidas a anticuerpos se aislaron con un soporte magnético Dynal estándar para dejar células B enriquecidas en los sobrenadantes. Los sobrenadantes recogidos se lavaron entonces con RPMI + 10% de suero fetal bovino (FBS).

50

55

Clasificación de subconjuntos de células B (células B sin tratamiento frente a células B de memoria + plasmáticas):

Las células B enriquecidas mediante Dynal se tiñeron con IgD-FITC, CD38-cychrome, CD19-APC, y CD27-PE, siguiendo protocolos de tinción estándar. Las dos poblaciones separadas de células B sin tratamiento previo (IgD⁺CD19⁺CD38^{int/}CD27⁻) frente a las células B de memoria y plasmáticas (IgD⁻CD19⁺CD38^{int/+}CD27⁺) se clasificaron en un citómetro de flujo de altas prestaciones MoFlo-MLS, que está equipado con un láser de argón enfriado con aire spectra physics (488 nm) y un láser de diodo de 635-nm, y con filtros para la detección de FITC a 530/40 nm, PE a 580/30 nm, APC a 670/20 nm, y cychrome (PE-Cy5) a 670/30 nm. Las células B clasificadas

60

65

se analizaron en un citómetro MoFlo para determinar la pureza, y se encontró que eran 97% (células B de memoria y plasmáticas) y 98% (células B sin tratamiento previo) puras. Las células clasificadas se colocaron en Trizol, y se almacenaron a -70°C.

5 *Producción de librería de ADNc:*

Se obtuvieron librerías de sustracción de ADNc a partir de los subconjuntos de células B clasificadas, usando un protocolo de hibridación sustractivo de análisis de diferencia representacional estándar. Las librerías de sustracción incluyeron la librería de ADNc de células B de memoria + plasmáticas, en la que el ADNc sin tratamiento previo se restó dos veces, y la librería de ADNc de células B sin tratamiento previo, en la que el ADNc de memoria + plasmático se restó dos veces. Con técnicas de biología molecular estándar, la librería de sustracción de ADNc se ligó en el vector plasmídico estándar y se transformó en células de *E. coli* (DH-10B) electrocompetentes. Las células de *E. coli* transformadas se colocaron en placas de agar LB en presencia de antibióticos de selección. Las colonias bacterianas individuales, que representan cada una un inserto específico, se amplificaron usando PCR de colonia estándar.

Identificación y confirmación de la expresión diferencial.

Los insertos de la librería de sustracción de ADNc se desnaturalizaron y se transfirieron sobre 2 filtros de nailon idénticos, y se hibridaron separadamente con dos sondas diferentes marcadas desnaturalizadas – ADNc (memoria + plasma) – sin tratamiento previo (restado dos veces) y ADNc sin tratamiento previo – (memoria + plasma) (restado dos veces). Un inserto de ADNc de la librería de sustracción se consideró positivo si el inserto se hibridó selectivamente de forma preferente con una de las dos sondas. Los clones de ADNc para CS1 se hibridaron de forma preferente con la sonda de ADNc (memoria + plasma) – sin tratamiento previo (restado dos veces).

Identificación de CS1:

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

Caracterización y confirmación de la expresión génica de CS1:

La expresión preferencial de los clones positivos seleccionados, incluyendo CS1, se confirmó mediante análisis de transferencia de punto. Se puntearon cantidades iguales de ADNc (sin restar) (20 ng), aislado de células B clasificadas sin tratamiento previo frente a células B de memoria + plasmáticas sobre filtros de nailon, y se hibridaron con un inserto de ADNc marcado, para el clon positivo. Para estos ensayos, se sintetizó ADNc de subconjuntos de células B de sangre periférica obtenidos de 2 clasificaciones separadas (n = 9 adultos sanos y n = 10 adultos sanos, pureza > 97% y >98%, respectivamente). Los filtros se lavaron, y la señal procedente de las sondas hibridadas se detectó mediante autorradiografía. Un clon se consideró positivo si el ADNc se hibridó preferentemente al ADNc de las células B de memoria + plasmáticas a lo largo de ambos conjuntos de células B clasificadas sin tratamiento previo frente a células B de memoria + plasmáticas. Como se muestra en la Figura 1A, los datos indican que CS1 se expresa predominantemente en células B plasmáticas y de memoria.

CS1 se expresa principalmente en tejido linfóide:

Se prepararon transferencias de punto a partir de ADNc sintetizado a partir de polyA⁺ RNA, que se adquirió de Clontech (Palo Alto, California), y se obtuvieron de los siguientes tejidos: bazo, ganglio linfático, médula espinal, intestino delgado, cerebro, pulmón, músculo esquelético, corazón, riñón, e hígado. Las transferencias de punto se sondaron con ADN de CS1 marcado con digoxigenina (DIG), y se visualizaron mediante quimioluminiscencia (anticuerpo anti-DIG marcado con fosfatasa alcalina, y CPD-Star), siguiendo las recomendaciones del fabricante (kit de DIG Boehringer-Mannheim). Como se muestra en la Figura 1B, los resultados indican que CS1 es expresada principalmente en tejidos linfoides (bazo, ganglio linfático, médula ósea y posiblemente intestino delgado debido a linfocitos residuales en los parches de Peyer), y está ausente o es baja en otros órganos no linfoides (cerebro, pulmón, músculo esquelético, corazón, riñón, e hígado).

Ejemplo 2: Expresión diferencial de CS1

Células humanas:

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) mediante aislamiento a partir de gradientes de Ficoll-hypaque estándar. Las PBMC aisladas se resuspendieron entonces a 2×10^6 células/ml en un medio de cultivo reciente. Las PBMC se estimularon con fitohemaglutinina (PHA) a una concentración de 3 µg/ml durante 3 días, o con mitógeno obtenido de la raíz de *Phytolacca americana* (PWM) a una concentración de 10 µg/ml

durante 8 días. Las PBMC del control no estimuladas se prepararon sin ningún estímulo. Las células se cultivaron a 37°C en 7% de CO₂ en medio RPMI con 10% de FBS, penicilina, estreptomycin, y aditivos de glucosa.

5 *Células de ratón:*

Se obtuvieron bazo de dos ratones Balb/c. Los bazo se colocaron en un filtro de 100 micrómetros. Las células se separaron y se lavaron con PBS, y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. Los glóbulos rojos se lisaron con 2 ml de tampón de lisis a 37°C durante 2 minutos. Las células se lavaron dos veces, se resuspendieron en 10 ml del medio, y se contaron. Una porción de las células sin estimular se congeló directamente. Las células que quedan se estimularon con A a una concentración de 5 µg/ml durante 3 días, o con LPS a una concentración de 1 µg/ml durante 3 días. Las células se cultivaron en un medio DMEM con 10% de FBS, antibióticos, y aditivos de glucosa.

15 *Linfocitos B procedentes de pacientes con lupus frente a individuos sanos de edad parecida:*

Se clasificaron células B a partir de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus e individuos sanos, tiñendo las células con anticuerpo anti-CD19 humano marcado con FITC. Las células se clasificaron en un citómetro de flujo de altas prestaciones MoFlo-MLS, como se describen en el Ejemplo 1. Las células se recogieron en medio estéril para la síntesis de ARN.

Aislamiento de ARN total para PCR en tiempo real:

Las células se lavaron una vez y se colocaron en Trizol™ (Life Technologies, Gaithersburg, Maryland), y se aisló ARN total siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN total se trató con DNase libre de DNase (GenHunter, Nashville, Tennessee). El ARN digerido con DNase se extrajo con fenol/cloroformo, y se precipitó toda la noche con etanol. El ARN se lavó con etanol al 75%, y se disolvió en agua libre de nucleasas. El ARN aislado se cuantificó, y su integridad se analizó en un gel de agarosa.

30 *PCR en tiempo real:*

Se transfirió de forma inversa el ARN total (2 µg) procedente de los linfocitos B clasificados según pacientes con lupus frente a individuos sanos, en 100 µl de mezcla de reacción usando reactivos de transcripción inversa Taqman estándar (Applied Biosystems, Foster City, California). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo usando una mezcla maestra de PCR con verde de SYBR de Applied Biosystems. Los cebadores de CS1 se incorporaron en la mezcla para examinar los niveles de expresión de CS1 en ADNc de pacientes con lupus y de individuos sanos. Los cebadores de CS1 se diseñaron a partir de las secuencias publicadas (número de acceso Genbank XM-001635, AF390894). Como controles para normalización, se usaron cebadores de β-actina y 18S rRNA. Los cebadores se diseñaron usando un software Primer Express adquirido de Applied Biosystems. Los productos amplificados mediante PCR fueron 85 pb para los cebadores de CS1, 84 pb para los cebadores de β-actina, y 61 pb para los cebadores de 18S rRNA. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema GeneAmp 5700 SDS de Applied Biosystems, usando el protocolo recomendado.

45 *PCR en tiempo real de Ly9 nuevo de ratón:*

Se transcribió de forma inversa ARN total (2 µg) de muestras de conA, LPS, y sin estimular, en 100 µl de mezcla de reacción usando reactivos de transcripción inversa Taqman estándar (Applied Biosystems). Se montó una reacción de PCR usando una mezcla de PCR con verde de SYBR de Applied Biosystems. Se diseñaron cebadores específicos para Ly9 nuevo de ratón, a partir de la secuencia publicada (número de acceso de Genbank AF467909), y se incorporaron en la mezcla para examinar los niveles de expresión en muestras de ADNc estimuladas frente a las no estimuladas. Para la normalización, se usaron cebadores de 18S rRNA. Los cebadores se diseñaron usando el software Primer Express adquirido de Applied Biosystems. Los productos amplificados mediante PCR fueron 65 pb para los cebadores de Ly9 de ratón, y 61 pb para los cebadores de 18S rRNA. La PCR en tiempo real se llevó a cabo en un sistema de detección de secuencias GeneAmp 5700 de Applied Biosystems, usando el protocolo recomendado.

Ensayos de microconjuntos: preparación de la muestra, marcado de los microchips y huellas

Los perfiles de expresión de poblaciones leucocíticas activadas y no activadas se determinaron y analizaron usando chips génicos. El microconjunto oligonucleotídico Affymetrix GeneChip® personal permite la interrogación de aproximadamente 35.000 transcritos de ARNm únicos.

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

- *Purificación de poly A+ mRNA a partir de ARN total o limpieza de ARN total con el kit Qiagen's RNEASY® (purificación de poly A+ nRNA a partir de ARN total)*

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

10 Los tubos se centrifugaron durante 2 minutos a 14.000 hasta 18.000 g. Obsérvese que si la centrifugadora tiene una "posición suave", se debería de usar. El sobrenadante se eliminó sin perturbar el pelete de Oligotex. Se puede dejar una pequeña cantidad de disolución para reducir la pérdida de Oligotex. El sobrenadante se debería de guardar hasta que se haya producido cierta unión y elución satisfactorias de poly A+ nRNA.

15 El pelete se resuspendió suavemente en tampón de lavado OW2, y se pipeteó en la columna de giro. La columna de giro se centrifugó a velocidad completa (si es posible, en posición suave) durante 1 minuto. Tras la centrifugación, la columna de giro se transfirió a un nuevo tubo de recogida y se volvió a suspender suavemente en tampón de lavado OW2 y se centrifugó nuevamente como se describe aquí.

20 La columna de giro se transfirió a un nuevo tubo y se eluyó con 20 a 100 µl de tampón de elución calentado previamente (70°C). La resina de Oligotex se resuspendió suavemente pipeteando arriba y abajo, y después se centrifugó como antes. El procedimiento de elución se repitió con tampón de elución reciente. De otro modo, si es necesario un volumen bajo de elución, se puede usar sólo el primer eluato.

25 La absorbancia se leyó usando como blanco tampón de elución diluido.

- *Precipitación con etanol*

30 Antes de proceder con la síntesis de ADNc, se precipitó el ARNm. Ciertas sobras de componente o en el tampón de elución procedente del procedimiento de purificación de Oligotex inhibirá reacciones enzimáticas aguas abajo de la ARNm.

35 Se añadieron al eluato 0,4 vol. de 7,5 M de NH₄OAc + 2,5 vol. de etanol al 100% frío. La disolución se precipitó a -20°C 1 hora hasta toda la noche (o 20-30 min. a -70°C). La disolución precipitada se centrifugó a 14.000-16.000 x g durante 30 minutos a 4°C. El pelete se lavó con 0,5 ml de etanol al 80% (-20°C), después se centrifugó a 14.000-16.000 x g durante 5 minutos a temperatura ambiente. El lavado de etanol al 80% se repitió 1X. El pelete se secó en la campana. (No girar a vacío). El pelete se resuspendió en DPEC H₂O a una concentración de 1 µg/µl.

- *Limpieza del ARN total usando el kit RNeasy de Qiagen*

45 No se deberían de añadir más de 100 µg de ARN a una columna de RNeasy. El volumen de muestra se ajustó a 100 µl con agua libre de ARNasa, y se añadieron a la muestra 350 µl de tampón RLT y después 250 µl de etanol (100%). La disolución se mezcló pipeteando (no centrifugar), y después la mezcla se aplicó a una columna RNeasy mini spin. La columna mini spin se centrifugó durante 15 segundos a >10.000 rpm. Si hay problemas con el rendimiento, el flujo a través se puede volver a aplicar a la columna y se centrifuga nuevamente.

50 La columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida de 2 ml, y se añadieron 500 µl de tampón RPE y se centrifugó durante 15 segundos a >10.000 rpm. El flujo a través se desechó nuevamente, después se centrifugó durante 2 min. a velocidad máxima para secar la membrana de la columna. La columna se transfirió a un nuevo tubo de recogida de 1,5 ml, y se aplicaron directamente 30-50 µl de agua libre de ARNasa en la membrana de la columna. La columna se centrifugó durante 1 minuto a >10.000 rpm, y se repitió la elución.

55 Se tomó una lectura de la absorbancia. Si es necesario, el eluato se puede precipitar con acetato de amonio y un volumen 2,5X de etanol al 100%.

Obtención de ADNc usando el kit "SUPERSRIPT® Choice Sistem for cDNA Synthesis" de Gibco

- *Síntesis de ADNc de primera hebra*

65 Como material de partida, se usaron 5 µg de ARN total, o 1 µg de polyA+ mRNA. Para ARN total, se usaron 2 µl de SUPERSRIPT® RT (kit con transcriptasa inversa para la síntesis de ADNc) (para polyA+ mRNA, úsese 1 µl de SUPERSRIPT® RT). El volumen final de la mezcla de la síntesis de la primera hebra debería ser 20 µl. El ARN debe estar en un volumen no mayor que 10 µl. El ARN se incubó con 1 µl de 100 pmoles de T7-T24 oligo

durante 10 min. a 70C. En hielo, se añadieron 7 µl de: 4 µl 5X de tampón de 1ª hebra, 2 µl de 0,1 M de DTT, y 1 µl de mezcla de dNTP 10 mM. La mezcla se incubó a 37°C durante 2 min., después se añadió SUPERScript® RT.

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

- *Síntesis de la segunda hebra*

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

10 A la mezcla se añadieron:

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

20 Lo anterior se debería de obtener en una mezcla si hay más de 2 muestras. La mezcla añadida se incubó durante 2 horas a 16C.

Se añadieron 2 µl de T4 ADN polimerasa, y se incubó posteriormente durante 5 min. a 16C. Se añadieron 10 µl de 0,5 M de EDTA para detener la reacción.

- *Limpieza de ADNc*

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

30 Los tubos de PLG (gel de bloqueo de fase) se centrifugaron durante 30 segundos a velocidad máxima, y se transfirieron a un nuevo tubo de PLG. Se añadió un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico, y se agitó vigorosamente (no someter a remolino). Los tubos se centrifugaron durante 5 minutos a velocidad máxima. La disolución superior de la capa acuosa se transfirió a un nuevo tubo. La disolución acuosa se precipitó con etanol añadiendo 7,5X de 5M NH₄Oac y 2,5X en volumen de etanol al 100%. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a temperatura ambiente durante 20 min., a velocidad máxima. El sobrenadante se eliminó, y el pelete se lavó 2X con etanol al 80% frío. Elimínese tanto lavado de etanol como sea posible, y después déjese secar el pelete al aire. El pelete se resuspendió en 3 µl de agua libre de ARNasa.

- *Transcripción in vitro (IVT) y marcaje con biotina*

40 Se pipetearon 1,5 µl de ADNc en un tubo de PCR de paredes delgadas. La mezcla de marcaje de NTP se añadió a temperatura ambiente al tubo de PCR.

Mezcla de marcaje de NTP:

- 45 2 µl T7 10xATP (75 mM) (Ambion)
- 2 µl T7 10xGTP (75 mM) (Ambion)
- 1,5 µl T7 10xCTP (75 mM) (Ambion)
- 1,5 µl T7 10xUTP (75 mM) (Ambion)
- 50 3,75 µl 10 mM Bio-11-CTP
- 0,75 µl 10 mM Bio-16-UTP
- 2 µl 10x tampón de transcripción T7 (Ambion)
- 2 µl 10x mezcla de enzima T7 (Ambion)

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

Limpieza con RNeasy del producto de IVT

60 Véase anteriormente para el procedimiento.

El ARNc marcado se precipita con etanol y se resuspende en un volumen compatible con la etapa de fragmentación.

- *Fragmentación*

Se fragmentaron aproximadamente 15 ug de ARN marcado, usando la siguiente técnica. El volumen de la reacción de fragmentación se minimizó hasta aproximadamente 10 μ l de volumen, pero no más de 20 μ l debido a problemas de precipitación del magnesio con el tampón de hibridación.

El ARN se fragmentó incubando a 95°C durante 35 minutos en 1 x tampón de fragmentación.

5 x *Tampón de fragmentación:*

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

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

- *Conjunto de microchip*

El conjunto de microchip EOS HuO3 usado en todos los experimentos es un conjunto oligonucleotídico personalizado de Affymetric GENECHIP® que comprende 59.680 conjuntos de sondas que representan 46.000 secuencias únicas, incluyendo exones tanto conocidos como predichos de FGENESH que se basaron en el primer borrador del genoma humano. Los conjuntos de sondas HuO3 consisten solamente en sondas de un emparejamiento perfecto, teniendo la mayoría de los conjuntos de sondas 6 o 7 sondas.

- *Hibridación en conjunto de microchip*

Se pipetearon 200 μ l (10 ug de ARNc) de mezcla de hibridación sobre el microchip. Si se van a realizar múltiples hibridaciones (tal como un ciclo a través de un conjunto de 5 chips), entonces se recomienda que se obtenga una mezcla inicial de hibridación de 200 μ l o más.

Mezcla de hibridación: ARN marcado fragmentado (50 ng/ μ l de concentración final)

50 pM de oligo control 948-b
1,5 pM de BioB
5 pM de BioC
25 pM de BioD
100 pM de CRE
0,1 mg/ml de ADN de esperma de arenque
0,5 mg/ml de BSA acetilada
hasta 300 μ l con 1x de tampón de hibridación MES

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

- *Normalización de los datos de expresión génica*

El dato de expresión génica se normalizó ajustando el dato de intensidad del nivel de la sonda procedente de cada conjunto a una distribución γ fija, usando una función γ inversa para cartografiar la distribución acumulativa empírica de intensidades a la distribución γ deseada. Este procedimiento es semejante a otros procedimientos de normalización por chip, tal como la fijación de la media y SD de cada chip a un valor estándar, excepto que es más restrictivo por cuanto fija toda la distribución de intensidades en lugar de uno o dos parámetros. El fin de la normalización por chip es eliminar variaciones entre chips, suponiendo que sea atribuible a factores no biológicos, es decir, ruido técnico. El parámetro de escala para la distribución se escogió para producir una distribución con un valor medio arbitrario de 300, y el parámetro de la forma de 0,81 se escogió para reproducir la forma típica de la distribución empírica observada en muestras buenas.

Se calculó una única medida de intensidad media para cada conjunto de sondas usando la trimedia de Tukey de la intensidad de las sondas constituyentes. La trimedia es una medida de la tendencia central que es resistente a los efectos de valores atípicos. Finalmente, se aplicó una resta de fondo a cada medida de intensidad media para corregir la hibridación no específica. La medida de intensidad media de un conjunto de sondas "nulo" que consiste en 491 conjuntos de sonda con secuencia revuelta se restó de todos los otros conjuntos de sondas en el chip.

Protocolo de marcaje proporcionado aquí

Reacción de hibridación:

5 Comienzo con IVT no biotinilada (purificada mediante columnas RNeasy)
(véase el ejemplo 1 para las etapas de tejido a IVT)

ARN antisentido de IVT; 4 µg:	µl
Hexámeros al azar (1 µg/µl)	4 µl
H ₂ O:	µl
Volumen total:	14 µl

10 - Incúbese a 70°C, 10 min. Póngase en hielo

Transcripción inversa:

5X Tampón de primera hebra (BRL):	6 µl
0,1 M de DTT	3 µl
50X mezcla de dNTP:	0,6 µl
H ₂ O	2,4 µl
Cy3 o Cy5 dUTP (1 mM):	3 µl
SS RT II (BRL):	1 µl
Volumen total:	16 µl

15 - Añádase a la reacción de hibridación.

- Incúbese 30 minutos, 42°C.

- Añádase 1 µl de SSII y déjese continuar durante otra hora.

20 - Póngase en hielo

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

25 *Degradación de ARN:*

- Añádanse 1,5 µl de 1M de NaOH/2 mM de EDTA, incúbese a 65°C, 10 min.

H ₂ O	86 µl
10N de NaOH	10 µl
50 mM de EDTA	4 µl

30 U-Con 30 500 µl TE/hágase girar la muestra a 7000 g durante 10 min., manténgase el caudal para purificación.

Purificación mediante Qiagen:

35 - suspéndase el material recuperado u-con en 500 µl de tampón PB
- procédase con el protocolo normal de Qiagen

Digestión con ADNasa:

40 - añádase 1 µl de 1/100 dil de ADNasa/30 µl de Rx, e incúbese a 37°C durante 15 min.
- 5 min. a 95°C para desnaturalizar la enzima.

Preparación de la muestra:

45 - añádase:

Cot-1 DNA:	10 µl
50X dNTPs:	1 µl
20X SSC:	2,3 µl
<hr/>	
Pirofosfato de Na	7,5 µl

100 mg/ml de ADN de esperma de arenque 1 μ l de dilución 1/10

Volumen final: 21,8 μ l

- 5
- Secar en vacío a velocidad.
 - Resuspéndase en 15 μ l de H₂O.
 - Añádanse 0,30 μ l de 10% de SDS.
 - Caliéntese 95°C, 2 min.
 - Enfríese lentamente a temperatura ambiente durante 20 min.

10

Póngase en un portaobjetos e híbridese toda la noche a 64°C.

Lavar después de la hibridación:

3X SSC/0,03% de SDS:	2 min. 37,5 ml de 20X SSC+0,75 ml de 10% de SDS en 250 ml de H ₂ O
1X SSC:	5 min. 12,5 ml de 20X SSC en 250 ml de H ₂ O
0,2X SSC:	5 min. 2,5 ml de 20X SSC en 250 ml de H ₂ O

15

- Séquense los portaobjetos en una centrífuga, 1000 RPM, 1 min.
- Hágase un barrido a ajustes apropiados del tubo fotomultiplicador y canales de fluorescencia.

20

CS1 es sobreexpresada en leucocitos pero no en diversos tipos de tejidos no linfoides

Para evaluar el perfil de expresión de CS1, se analizó ARNm, aislado de leucocitos y de otros tejidos, mediante PCR en tiempo real. Como se muestra en la Figura 2A, el nivel de expresión de ARNm fue mucho mayor en leucocitos que aquel de la mayoría de otros tejidos adultos normales. Otros tejidos adultos normales que no mostraron expresión de CS1 por encima de los niveles base incluyeron tejido adiposo, de la glándula suprarrenal, de la aorta, de la válvula aórtica, del apéndice, de la arteria coronaria, de la vejiga, de hueso, de médula ósea, de mama, de bronquio, de cuello uterino, de cerebro, de médula espinal, de diafragma, de endometrio, de epidídimo, de esófago, de vesícula biliar, de ganglio, de corazón, de laringe, de labio, de hígado, de pulmón, de músculo, de miometrio, de nervio vago, de omento, de mucosa oral, de ovario, de páncreas, paratiroideo, de mucosa faríngea, de placenta, de próstata, de retina, de glándula salivar, de piel, de estómago, de sinovio, de testículos, de timo, de tiroide, de lengua, de tráquea, de cordón umbilical, de uréter, de útero, de vagina, o de vena. ARNm de CS1 se expresó en células seleccionadas de colon (2/11), riñón (1/20), intestino delgado (1/3), bazo, y amígdala (2/4). Los resultados indicaron que CS1 se expresa principalmente en leucocitos, y debería ser una buena diana para enfermedades autoinmunitaria.

35

La expresión de CS1 aumenta en múltiples poblaciones leucocíticas activadas

Para evaluar la correlación entre la expresión de CS1 y la activación de leucocitos, se analizó la expresión de ARNm de CS1 en múltiples poblaciones de leucocitos activados y no activados. Como se muestra en la Figura 2B, la expresión de CS1 aumentó en células B activadas, células DC maduras, células CD3 activadas (aumento bajo a moderado), células CD4 activadas (incremento de nivel bajo), y células CD8 activadas (incremento bajo a moderado, dependiendo del donante), en comparación con sus poblaciones de control no activadas correspondientes. Estos resultados indicaron que la sobreexpresión de CS1 se correlaciona con la activación de varios subconjuntos de leucocitos.

45

Ejemplo 3: Producción de antígenos para generar anticuerpos monoclonales frente a CS1.

Clonación:

50

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

Transfección estable de CS1 ECD-Fc γ 3:

55

Se linealizaron 50 μ g de plásmido CS1 ECD-Fc γ 3 con enzima Fsp1, y el ADN se precipitó en etanol, se lavó, y se resuspendió en 500 μ l de PBS estéril. Las células NSO se lavaron dos veces en PBS fría, y se resuspendieron a 2×10^7 por un ml de PBS. Para la transfección, se usó una cantidad de 1×10^7 células.

60

Se combinaron 500 μ l de células NSO con 500 μ l de ADN en PBS. Las células se electroporaron a 1,5 V y 3 μ F mediante un pulsador BioRad Gene. Las células se añadieron a 100 ml de medio completo DMEM, y se colocaron en diez placas de 96 pocillos. Se añadió medio de selección micofenólica, a 1 μ g/ml, 24 horas después

de la transfección. Los transfectantes positivos se identificaron después del 10^o día, y se expandieron en placas de 48 y 24 pocillos. Los transfectantes positivos se volvieron a identificar, y los productores elevados se expandieron para la purificación proteica.

5 *Purificación de la proteína CS1 ECD-Fc γ 3.*

Los transfectantes estables que expresan la proteína de fusión CS1-ECD Fc γ 3 se expandió en 600 ml de medio completo DMEM con aditivos de glucosa durante cinco días. La proteína de fusión se purificó en una columna de proteína G-sefarosa, y se dializó frente a 1x PBS. Las formas reducida y no reducida de CS1 ECD-Fc γ 3 se analizaron mediante Coomassie. CS1 ECD Fc γ 3 también se analizó mediante transferencia Western usando anti-HulG, y se confirmó mediante secuenciación N-terminal. Para inmunizar a ratones, se usó la proteína de fusión CS1-Fc γ 3 purificada.

15 *Producción de proteína de fusión CS1 ECD-myc-GPI:*

El dominio extracelular (ECD) de CS1 se aisló de células Raji usando cebadores que flanquean el dominio extracelular de CS1. El producto de la PCR se purificó en gel y se ligó en un vector que expresa una etiqueta myc y enlace de glucosil fosfatidilinositol para la expresión de la superficie celular (vector myc-GPI). El plásmido que contiene CS1 ECD-myc-GPI se purificó a gran escala y se confirmó mediante secuenciación de ADN.

20 *Transfección estable de CS1 ECD-myc-GPI:*

Se linealizaron 50 μ g de plásmido CS1 ECD-myc-GPI con enzima Fsp1, y el ADN se precipitó en etanol, se lavó, y se resuspendió en 500 μ l de PBS estéril. Las células NSO se lavaron dos veces en PBS fría, y se resuspendieron a 2×10^8 por un ml de PBS. Para la transfección, se usó una cantidad de 1×10^8 células.

Se combinaron 500 μ l de células NSO con 500 μ l de ADN en PBS. Las células se electroporaron a 1,5 V y 3 μ F mediante un pulsador BioRad Gene. Las células se hicieron crecer a 37°C en 5% de CO₂ con 1 μ g/ml de selección micofenólica, y después se subclonaron en placas de 96 pocillos. Los transfectantes positivos se identificaron con anticuerpo anti-myc. Los productores elevados de transfectantes CS1 ECD-myc-GPI se seleccionaron y se expandieron para ensayos *in vitro*.

Ejemplo 3: Producción de anticuerpos monoclonales anti-CS1

35 *Inmunógenos para CS1 humana:*

La proteína de fusión CS1 ECD- γ 3 humana recombinante purificada se usó para inmunizar ratones Balb/c vía almohadillas de las patas (CS1 EDC se refiere al dominio extracelular de CS1 descrito anteriormente). De forma breve, los ratones se inmunizaron en las almohadillas de las patas traseras con 10 μ g de proteína con un volumen igual de adyuvante Ribí en un volumen total de 25 μ l. Las inmunizaciones en las almohadillas de las patas se llevó a cabo 4 veces a intervalos de 4 o 5 días.

a. Fusión celular.

45 Se sacrificaron dos ratones inmunizados con CS1 ECD- γ 3. Los ganglios linfáticos femoral poplíteo y sacro se retiraron de los ratones. Se aislaron linfocitos de los tejidos, y se generaron hibridomas mediante procedimientos estándar. De forma breve, se generaron hibridomas mediante fusión, mediada por polietilenglicol (PEG) 1500, entre linfocitos y una estirpe celular de mieloma murino (células NSO). Las células fusionadas se colocaron en placas de 96 pocillos a una densidad de 10^7 células por placa. La selección de las células fusionadas se logró usando medio HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina).

b. Identificación de hibridomas

55 La especificidad de los anticuerpos segregados por los hibridomas se determinó mediante un ensayo de unión a base de citometría de flujo (FACS) a células que expresan CS1. El ensayo de FACS se llevó a cabo usando protocolos estándar. Los transfectantes estables NSO que expresan el dominio extracelular de CS1 superficial (2×10^5) se resuspendieron en 50 μ l de PBS enfriada con hielo con 50 μ l de sobrenadante de cultivo de hibridoma en hielo durante 1 hora. Después de un intenso lavado, las células se incubaron con anticuerpos específicos anti-IgG de ratón de cabra conjugados con ficoeritrina, durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron nuevamente, y los anticuerpos unidos a la superficie celular se detectaron mediante FACS usando un Becton Dickinson FACScan. Como se muestra en la Tabla 1, los anticuerpos Luc2, Luc3, Luc15, Luc20, Luc22, Luc23, Luc29, Luc32, Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc39, Luc56, Luc60, Luc63, o Luc90, se unen fuertemente a las células NS-CS1 transfectadas con CS1, pero no a NSO-FcRn. Los anticuerpos anti-CS1 humana se unieron a las células K562 y Daudi (que se sabe que expresan CS1 nativa), pero no a las células Jurkat de control negativo. 65 Los datos muestran que los anticuerpos anti-CS1 producidos son capaces de unirse específicamente a CS1.

También se muestran en la tabla los resultados del ensayo (mediante ELISA) de la unión de anticuerpos Luc a proteína de fusión CS1- γ 3 frente AR-G3 (proteína de fusión γ 3) de control negativo. Los anticuerpos Luc se unen específicamente a CS1- γ 3, y no a la proteína de fusión AR- γ 3 de control negativo.

Tabla 1. mAb anti-CS1 humana generados a partir de la fusión 342										
Resultados	MAB	NSO-CS1	NSO-FcRn	FACS (MFI)			ELISA (captura)		Subclones	Ratón Ig ISO
				K562	Daudi	Jurkat	CS1-G3	AR-G3		
1	Luc2	162	< 5	13,4	10,5	< 5	1,0	0,2	Luc2-1	IgG1
2	Luc3	377	< 5	25,7	7,8	< 5	0,9	0,5	Luc3-F	IgG1, G2b
3	Luc15	110	< 5	14,0	12,4	< 5	1,1	0,3	Luc15-1	ND
4	Luc20	89	< 5	8,0	12,6	< 5	1,2	0,2	Luc20-1	ND
5	Luc22	228	< 5	14,7	6,1	< 5	0,6	0,2	Luc22-1	IgG2b
6	Luc23	164	< 5	19,6	10,2	< 5	0,6	0,2	Luc23-1	IgG1
7	Luc29	86	< 5	24,1	11,9	< 5	0,9	0,2	Luc29-D6, C8	IgG1
8	Luc32	201	< 5	9,8	10,7	< 5	0,8	0,2	Luc32-1	IgG1
9	Luc34	127	< 5	26,2	10,3	< 5	1,2	0,3	Luc34-1, 34-3	IgG1
10	Luc35	184	< 5	10,6	29,7	< 5	0,7	0,2	Luc35-1	IgG2a
11	Luc37	366	< 5	12,8	7,2	< 5	0,6	0,2	Luc37- C12,F11	IgG2b
12	Luc38	112	< 5	31,4	11,6	< 5	0,8	0,2	Luc38-1	IgG2b
13	Luc39	117	< 5	12,0	17,5	< 5	0,4	0,2	Luc39-E10	IgG2a
14	Luc56	132	< 5	12,6	9,7	< 5	1,0	0,2	Luc56-1	IgG2a
15	Lug60	230	< 5	14,6	10,4	< 5	0,9	0,3	Luc60-2	IgG2b
16	Luc63	214	< 5	15,8	12,7	< 5	0,6	0,2	Luc63-1	IgG2a
17	Luc90	237	< 5	9,7	10,1	< 5	0,8	0,1	Luc90-H1, D9	IgG2b
	Control ISO	14	3	5,41	6,02	< 5	0,16	0,14		
	Anti-Myc	193	335	6,62	6,85	< 5	0,19	0,15		

5

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos monoclonales anti-CS1 producidos

Las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de los anticuerpos se clonaron usando técnicas estándar. De forma breve, se usó ARN total procedente de $1-5 \times 10^6$ células para preparar ADNc usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE cDNA (BD Biosciences Clontech), y las regiones variables se amplificaron mediante PCR usando cebadores específicos del gen complementarios a las regiones constantes de la cadena pesada y ligera de ratón.

10

En la Tabla 4 se muestran las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada madura y de la cadena ligera madura de los anticuerpos Luc90, Luc63, y Luc34.

15

Ejemplo 4: Caracterización de anticuerpos anti-CS1

Se usó un ensayo de competición de citometría de flujo para determinar la especificidad epitópica de 14 anticuerpos monoclonales CS1 diferentes. Se incubaron transfectantes estables NSO que expresan CS1 de superficie (2×10^5) en hielo durante 1 hora con 50 μ l de anticuerpos anti-CS1, incluyendo combinaciones por parejas de Luc23, Luc29 Luc34, Luc35, Luc37, Luc38, Luc 63, y Luc90. En paralelo, como control negativo se usó el anticuerpo de control de isotipo (AIP-13). Los anticuerpos monoclonales anti-CS1 (Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63, y Luc90) biotinilados se incubaron a 1 μ g/ml con la mezcla de células/anticuerpos durante 30 minutos adicionales, en hielo. Después de un intenso lavado, las células se incubaron con estreptavidina conjugada con ficoeritrina, durante 1 hora en hielo. Las células se lavaron, y los anticuerpos biotinilados unidos a la superficie celular se detectaron mediante FACS usando un Becton Dickinson FACScan.

20

25

Los anticuerpos sin marcar: Luc23, Luc34, Luc37, Luc38, Luc63, y Luc90 se ensayaron para determinar la capacidad para competir entre sí a una concentración de 15 μ g/ml, 3 μ g/ml, y 0,6 μ g/ml, y los anticuerpos que compiten o de bloqueo se añadieron a 1 μ g/ml. Como control negativo, se usó AIP-13, puesto que este anticuerpo no se une a CS1 ni compete con ninguno de los anticuerpos Luc. En la figura se muestra el nivel de fluorescencia (intensidad de fluorescencia media) (MFI) de los anticuerpos biotinilados. Una disminución significativa en la MFI indicó competición por CS1 de superficie celular mediante Mab anti-CS1 biotinilado frente a Mab anti-CS1 sin marcar, en al menos 50% en comparación con la MFI del anticuerpo de control.

30

35

La Figura 3 representa un resultado ejemplar de los ensayos de competición entre los anticuerpos Luc cuando se usan los anticuerpos monoclonales Luc de bloqueo a una concentración de 15 μ g/ml y 3 mg/ml. Los ensayos de competición indicaron que varios de los anticuerpos Luc entran en contacto con epítomos distintos. Luc38 entra en contacto con un epítomo distinto de los epítomos de Luc37, 23, 90, y 63. Luc63 entra en contacto con un epítomo separado, que no solapa, que es diferente de los epítomos de Luc37, 23, 90, y 38. Luc90 entra en contacto con un epítomo diferente, que no solapa, distinto de los epítomos de Luc 37, 23, 63, y 38. Luc 23 entra

40

en contacto con otro epítipo que no solapa, distinto de los epítipos de Luc90, 63, y 38. Luc37 entra en contacto con un epítipo que no solapa adicional, distinto de los epítipos contactados por Luc90, 63, y 38. Luc63 entra en contacto con un epítipo que solapa con Luc34, mientras que Luc90 entra en contacto con un epítipo que solapa con Luc34. Luc37 entra en contacto con un epítipo que solapa con el epítipo de Luc23. Luc34 bloquea o disminuye significativamente la unión de todos los anticuerpos Luc, y puede entrar en contacto con un epítipo expuesto, amplio, o puede tener una mayor afinidad por CS1. Luc37, Luc23, y Luc38 no bloquean la unión a CS1 mediante el anticuerpo Luc34. Los epítipos para Luc37, Luc23, y Luc38 se pueden "enterrar" en la estructura secundaria de CS1, o la afinidad por CS1 puede ser menor que la afinidad del anticuerpo Luc34.

También se ensayaron mediante análisis de Biacore las afinidades relativas de tres anticuerpos monoclonales. El análisis cinético de los MAb anti-CS1 mediante medidas de SPRKinetics entre la proteína de fusión CS1 humana-Fc y anticuerpos monoclonales de ratón anti-CS1 humana Luc34.1, 63.2, y 90H1 se llevaron a cabo usando Biacore 2000 (Biacore, Suecia). La condición de regeneración se estableció inmovilizando alrededor de 10000 RU de cada anticuerpo sobre diferentes células de flujo, e inyectando CS1-Fc sobre la superficie, seguido del ensayo de una serie de tampones diferentes hasta que se encontró el mejor para optimizar el aclaramiento de CS1-Fc de cada anticuerpo. Se encontró que un tampón de 10 mM de glicina, pH 2,0, es el tampón de regeneración óptimo, y se ensayó inmediatamente para determinar su reproducibilidad sobre 10 ciclos de inyección de CS1-Fc y regeneración del tampón. El tampón se encontró que era adecuado para regenerar reproduciblemente la superficie de los anticuerpos. Por tanto, 10 mM de glicina, pH 2,0, fue el tampón de regeneración designado para los experimentos de Biacore de CS1-Fc y de los anticuerpos.

El anticuerpo anti-CS1 producido por nosotros se inmovilizó con unidades de respuesta baja (RU) que oscilan desde 99,4 RU hasta 133,7 RU en el chip sensor de CM5 de grado investigación mediante reactivos de acoplamiento de amina Biacore (N-etil-N'-dimetilaminopropilcarbodiimida, EDC; N-hidroxisuccinimida, NHS; y etanolamina HCL, pH 8,5). Los ensayos se realizaron a un caudal de 30 ul/min. a temperatura ambiente. Una fase de asociación de tres minutos de CS1-Fc fue seguida de la inyección durante diez minutos de tampón de ejecución (10 mM de Hepes, 30 mM de cloruro de sodio, 3 mM de EDTA, 0,05% de P-20, pH 7,4) para monitorizar la disociación para cada ciclo de unión, con diferentes concentraciones de CS1-Fc por ciclo. La superficie de regeneración se regeneró con 10 mM de glicina, pH 2,0. La cinética de unión de cada par CS1-Fc y anticuerpo se calculó a partir de un análisis global de datos de sensograma recogidos a partir de doce concentraciones diferentes de CS1-Fc (1024 nM, 512 nM, 256 nM, 128 nM, 64 nM, 32 nM, 16 nM, 8 nM, 4 nM, 2 nM, 1 nM, 0,5 nM) por duplicado, usando el programa BIAevaluate. Se aplicó una doble referencia en cada análisis para eliminar respuestas de fondo procedentes de la superficie de referencia y control sólo de tampón. La afinidad (K_D) de la unión se obtuvo ajustando simultáneamente las fases de asociación y disociación del sensograma procedentes de la serie de concentraciones de analito usando el modelo de analito bivalente del software BIAevaluate. El experimento se llevó a cabo tres veces para estudiar la desviación estándar de los datos.

Las afinidades de unión de Luc 90.H1, Luc63.2, y Luc43.1 se resumen en la Figura 4. Luc90.H1 tiene la afinidad de unión más elevada entre estos tres anticuerpos. La afinidad de unión de Luc90.H1 es 5,5 veces mayor que la de Luc63.2, y 28 veces mayor que la de Luc43.1.

Tinción inmunohistológica con anticuerpos anti-CS1:

Las células transfectadas con CS1 se examinaron también para determinar la tinción inmunohistológica con anticuerpos anti-CS1. Se añadió a las células transfectadas con CS1 una cantidad de 10 µg/ml de anticuerpo monoclonal primario anti-CS1. Las células se bloquearon entonces con suero y se incubaron con el anti-Ig de ratón conjugado con biotina. Entonces se mezcló la avidina-peroxidasa con las células y se desarrolló con AEC (un reactivo de peroxidasa estándar). El color rojo de AEC indicó la tinción positiva, mientras que los núcleos de las células ensayadas se contratiñeron con hematoxilina (azul). Los datos indicaron que las células transfectadas con CS1 se tiñeron positivamente con los anticuerpos anti-CS1, mostrando que los anticuerpos anti-CS1 producidos son capaces de unirse a CS1 expresada en la superficie de las células (Figura 5A). De este modo, los anticuerpos anti-CS1 son adecuados para uso no sólo en la detección de la expresión sobre la superficie de células de sangre periférica en disolución, sino también de detectar mediante inmunohistoquímica (IHC), que se usa típicamente para analizar secciones de tejidos (por ejemplo, ganglios linfáticos de pacientes o biopsias de tejidos).

La Figura 5B muestra la tinción inmunohistológica de amígdala inflamada con dos anticuerpos anti-CS1, Luc90 y Luc63. Los paneles C y D en la Figura 5B muestran la tinción con CD138, que tiñe las células plasmáticas y las células epiteliales. Los paneles superiores (Figura 5B, paneles A y B) muestran la tinción de sección en serie con anticuerpos anti-CS1. A partir del patrón solapante de la tinción, es evidente que los anticuerpos anti-CS1 tiñen células plasmáticas en amígdala inflamada.

La Figura 5C muestra la tinción inmunohistológica de tejido sinovial procedente de la articulación de un paciente con artritis reumatoide con Luc63 anti-CS1. Las células plasmáticas se han infiltrado en el sinovio como se puede ver por la tinción con CD138 (panel superior, derecho). A partir del patrón solapante de la tinción (compárese el

panel superior derecho con el panel superior izquierdo), es evidente que los anticuerpos anti-CS1 tiñen células plasmáticas en las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide.

Patrón de expresión de la proteína CS1:

5

La expresión de la proteína CS1 se examinó adicionalmente con los anticuerpos Luc producidos mediante análisis FACS (Figura 6). Se aislaron PBMC de individuos sanos y de pacientes con lupus mediante un procedimiento de centrifugación con gradiente de Ficoll Hypaque estándar.

10

Las PBMC se tiñeron con anticuerpos como se indica siguiendo procedimientos estándar. Para la activación de las PBMC mediante mitógeno obtenido de la raíz de *Phytolacca americana* (PWM), se añadió PWM a una dilución 1:100 a las PBMC, que se colocaron subsiguientemente a 37°C en 7% de CO₂ durante 8 días. Las células estimuladas con PWM se cosecharon y se lavaron antes de la tinción con los anticuerpos. Los anticuerpos anti-CS1 de ratón usados aquí son Luc90 (IgG₂b), Luc63, Luc38, y otros anticuerpos Luc anti-CS1

15

producidos. Los anticuerpos de control de isotipo fueron anticuerpos IgG de ratón de isotipo emparejado. Los resultados indican que CS1 se expresó positivamente en células B activadas, células T CD8⁺ (tanto activadas como sin tratamiento previo), células NK (CD3-CD56⁺), células NKT (CD56⁺CD3⁺), leucocitos CD14^{+/lo} (monocitos y/o macrófagos), y células T CD4⁺ (bajo nivel en células activadas *in vitro*). CS1 se expresó en estas poblaciones celulares a partir tanto de adultos sanos como de pacientes con lupus. No se detectó la expresión significativa de la proteína CS1 en células T CD4⁺ inactivadas procedentes de adultos sanos, peletes, HuVEC, células de riñón, células de las vías respiratorias bronquiales, células de las vías respiratorias pequeñas, células de la próstata, hepatocitos, y células de mama.

20

25

En la Figura 6 se muestra la tinción de muestras de células B activadas, en la que se muestra la tinción de las PBMC activadas con PWM como una línea gruesa, mientras que la tinción del control de isotipo y las PBMC sin inactivar se mostró como líneas punteadas colocadas debajo. El patrón de expresión de CS1 es significativo, debido a que un anticuerpo terapéutico se une idealmente de forma principal a células diana y no se une a otras células y tejidos, especialmente plaquetas. El dato sugiere que los anticuerpos anti-CS1 son anticuerpos

30

Ejemplo 5: Humanización de anticuerpos anti-CS1

35

Este ejemplo describe la humanización del anticuerpo monoclonal murino Luc63 anti-CS1 (MuLuc63). La humanización de MuLuc63 se llevó a cabo esencialmente según el procedimiento de Queen, C. *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989)). En primer lugar, se identificaron los segmentos VH y VL humanos con homología elevada con las secuencias de aminoácidos de VH y VL de MuLuc63, respectivamente. Después, se injertaron las secuencias de CDR junto con los aminoácidos del marco importantes para mantener las estructuras de las CDR en las secuencias del marco humanas seleccionadas. El anticuerpo monoclonal humanizado

40

resultante (HuLuc63) se expresó en la estirpe celular de mieloma de ratón NS0. El anticuerpo HuLuc63 humanizado se unió a CS1 humana recombinante en un ensayo ELISA con un valor de EC50 de 70,1 ng/ml, similar al valor de EC50 de 66,1 ng/ml determinado para MuLuc63 en el mismo ensayo, indicando que HuLuc63 retuvo la elevada afinidad de unión por CS1 humana.

45

Clonación y secuenciación de los ADNc de las regiones variables de MuLuc63

50

Se extrajo ARN total de aproximadamente 5 x 10⁷ células de hibridoma productoras de MuLuc63, usando el reactivo de TRIzol (Life Technologies, Inc., Rockville, MD). Se sintetizó ADNc bicatenario usando el kit de amplificación de ADNc SMART RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA), siguiendo el protocolo del proveedor. Los ADNc de las regiones variables para las cadenas pesada y ligera se amplificaron mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando cebadores de 3' que se hibridaron respectivamente a las regiones C de las cadenas gamma y kappa de ratón, y un cebador universal de 5' proporcionado en el kit de amplificación de ADNc SMARTRACE. Para la PCR de VH, el cebador de 3' tiene la secuencia 5'-AGCTGGGAAGGTGTGCACAC-3' (SEC ID n°: 51). Para la PCR de VL, el cebador de 3' tiene la secuencia 5'-TTCAGTCCATCAATCTTCC-3' (SEC ID n°: 52). Los ADNc de VH y de VL se subclonaron en el vector pCR4Bhmt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para la determinación de la secuencia. La secuenciación del ADN se llevó a cabo mediante reacciones de secuenciación de ciclos de PCR con terminadores de cadena didesoxi fluorescentes (Applied Biosystems, Foster City, CA) según las instrucciones del fabricante.

60

Se secuenciaron cuatro clones plasmídicos para cada una de las cadenas pesada y ligera. Se identificaron secuencias únicas homólogas a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de ratón típicas. En las Tablas 5 y 6 se muestran las secuencias de aminoácidos deducidas de ADNc de las regiones V de MuLuc63 de las cadenas pesada y ligera.

65

Diseño de las regiones V de HuLuc63

La humanización de las regiones V de los anticuerpos se llevó a cabo como se esquematiza en Queen, C. *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)). En primer lugar, se constituyó un modelo molecular de las regiones variables de MuLuc63 con la ayuda de programas de ordenador ABMOD y ENCAD (Levitt, M., J. Mol. Biol. 168: 595-620 (1983)). Después, basándose en una búsqueda de homología frente a secuencias de ADNc de anticuerpos humanos, se seleccionó la secuencia de VH humana B55 3-14 (Cuisinier *et al.*, Bur. J. Imm. 23: 110-118 (1993)) y el segmento de J JH1 (Ravetch, J.V. *et al.*, Cell 27: 583-591 (1981)) para proporcionar los marcos para la región variable de cadena pesada de HuLuc63. Para la región variable de cadena ligera de HuLuc63, se usó la secuencia m-2R de VL de ADNc (Manheimner-Lory *et al.*, J. Exp. Med. 174:1639-1652 (1991)). La identidad de los aminoácidos del marco entre VH de MuLuc63 y los marcos humanos aceptores fue 81,6% (71/87), mientras que la identidad entre VL de MuLuc63 y los marcos humanos aceptores fue 76,3% (61/80).

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

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

En las Tablas 7 y 8, respectivamente, se muestran los alineamientos de las secuencias de aminoácidos de MuLuc63, HuLuc63, y del aceptor humano para VH y VL.

Construcción de los genes VH y VL de HuLuc63

Se diseñó un gen que codifica cada una de VH y VL de HuLuc63 como un minixón que incluye un péptido señal, una señal donante de corte y empalme, y sitios de enzimas de restricción apropiados para la clonación subsiguiente en un vector de expresión de mamífero. Las señales donantes de corte y empalme en los minixones de VB y VL derivaron de las secuencias de las estirpes germinales JH6 y JK4 humanas correspondientes, respectivamente. Las secuencias de los péptidos señal en los minixones de VH y VL de HuLuc63 derivaron de las secuencias de VH y VL de MuLuc63, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos deducidas de los genes VH y VL de Luc63 se muestran en las Tablas 5 y 6.

Los genes de VH y VL de HuLuc63 se construyeron mediante extensión de oligonucleótidos sintéticos que solapan que oscilan en longitud de 33 a 46 bases y amplificación mediante PCR (Stemmer *et al.*, Gene 164:49-53 (1995)). En la Tabla 9 se enumeran los oligonucleótidos para la síntesis de los genes de VH y VL de HuLuc63.

Los fragmentos amplificados mediante PCR se purificaron mediante el kit de purificación de PCR Qiaquick (Qiagen), y se digirieron con MluI y XbaI. El gen de VH de HuLuc63 se subclonó en pHuHCg1.D para crear el plásmido pHuHCg1.D-HuLuc63. El gen de VL de HuLuc63 se subclonó en pHuCkappa.rgpt.dE, un derivado del vector de expresión de la cadena ligera kappa pOKT3.Vk.rg (Cole, M.S. *et al.* J. Immunol. 159:3613-3621 (1997)), para crear el pHuCkappa.rgpt.dE-HuLuc63 plasmídico.

Expresión de HuLuc63

El anticuerpo HuLuc63 IgG1/ κ se produjo mediante transfección transitoria de células de cultivo tisular. La estirpe celular de riñón embrionario humano 293-H (Invitrogen, Carlsbad, CA) se mantuvo en DMEM (BioWhittaker, Walkersville, MD) que contiene 10% de FBS (HyClone, Logan, UT) y aminoácidos no esenciales (Invitrogen). Las células 293-H se colocaron en placas a 1×10^6 células por pocillo en un volumen de 2,5 ml en una placa de 6 pocillos el día antes de la transfección usando medio normal (DMEM + 10% de FBS + aminoácidos no esenciales). En el día de la transfección, se diluyeron 4 μ g de ADN plasmídico por pocillo en 250 μ l de Hybridoma-SFM (H-SFM, Invitrogen). Se diluyeron 10 μ l del reactivo de lipofectamina 2000 (LF2000, Invitrogen) por pocillo en 250 μ l de H-SFM. El ADN diluido se combinó con LF2000 diluido, y se incubó durante 20 minutos para permitir que se formaran los complejos de ADN-LF2000. Se añadieron 500 μ l de los completos de ADN-LF2000 a cada pocillo, y se mezclaron moviendo la placa hacia delante y hacia atrás. Las células se incubaron durante 5 días antes de cosechar el sobrenadante para el análisis.

La expresión de HuLuc63 se midió mediante ELISA de sándwich. Se revistieron placas Immulon 4 HBX (Thermo

Labsystems Franklin, MA) toda la noche a 4°C con 100 µl/pocillo de 1,8 µg/ml de anticuerpos policlonales específicos de la cadena de Fcγ anti-IgG humana de cabra (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., West Grove, PA) en tampón de carbonato de sodio/bicarbonato 0,2 M pH 9,4, se lavaron con tampón de lavado PBS que contiene 0,1% de Tween 20), y se bloquearon durante 30 min. a temperatura ambiente con 150 µl/pocillo de tampón de bloqueo SuperBlock en TBS (Pierce Chemical Company, Rockford, IL). Después de lavar con tampón de lavado, las muestras que contienen HuLuc63 se diluyeron apropiadamente en tampón de ELISA (PBS que contiene 1% de BSA y 0,1% de Tween 20), y se aplicaron 100 µl/pocillo a las placas de ELISA. Se usó un anticuerpo monoclonal anti-CD33 IgG1/κ humanizado HuM195 (Co, M.S. *et al.*, J. Immunol., 148: 1149-1154 (1992)). Después de incubar las placas durante 1 h a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando 100 µl/pocillo de una dilución 1:1000 de anticuerpos policlonales anti-cadena kappa humana de cabra conjugados con HRP (SouthernBiotech, Birmingham, AL). Después de incubar durante 1 h a temperatura ambiente y lavar con tampón de lavado, se llevó a cabo el desarrollo del color añadiendo 100 µl/pocillo de sustrato ABTS (KPL, Inc., Gaithersburg, MD). El desarrollo del color se detuvo añadiendo 100 µl/pocillo de 2% de ácido oxálico. La absorbancia se leyó a 415 nm usando un lector de microplacas VersaMax (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

Propiedades de unión de MuLuc63 y HuLuc63

Las afinidades de MuLuc63 y HuLuc63 por CS-1 humana se analizaron mediante ELISA de unión directa. Se revistieron pocillos de placas de ELISA de 96 pocillos (placas Immulon 4 HBX, Thermo Labsystems, Franklin, MA) con 100 µl de 1 µg/ml de proteína de fusión CS1 humana-Fcγ3 humana soluble, en PBS toda la noche a temperatura ambiente. Tras lavar con tampón de lavado, los pocillos se bloquearon con 150 µl de tampón de bloqueo superblock durante 30 minutos a temperatura ambiente. El anticuerpo HuLuc63 expresado transitoriamente, o el anticuerpo MuLuc63 purificado, se diluyeron apropiadamente en tampón de ELISA, y se aplicaron a placas de ELISA (100 µl por pocillo). Las placas de ELISA se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente, y los pocillos se lavaron con tampón de lavado. Después, se añadieron a cada pocillo de las placas de HuLuc63 y MuLuc63, respectivamente, 100 µl de anticuerpo-Cκ humana de cabra conjugado con HRP, o anticuerpo anti-Cκ de ratón de cabra conjugado con HRP (ambos de Southern Biotech) diluido 1:1000 en tampón de ELISA, y se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar con tampón de lavado, se añadieron a cada pocillo 100 µl de sustrato ABTS (KPL). El desarrollo del color se detuvo añadiendo 100 µl de ácido oxálico al 2% por pocillo. La absorbancia se leyó a 415 nm usando un lector de microplacas VERSAmx. Los resultados de los experimentos de unión de ELISA se muestran en la Fig. 7. MuLuc63 y HuLuc63 se unen a CS-1 humana-Fcγ3 de una manera dependiente de la concentración. El valor de EC₅₀ de HuLuc63, obtenido usando el programa de ordenador GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., San Diego, CA), fue 70,1 ng/ml. Este es similar al valor de EC₅₀ de 66,1 ng/ml obtenido para MuLuc63, indicando que la humanización del anticuerpo monoclonal anti-CS1 de ratón MuLuc63, fue exitosa: HuLuc63, retuvo una elevada afinidad de unión por CS1 humana. En la Figura 8 se muestra un modelo de la región variable de Luc63 humanizado.

Ejemplo 6: Papel de CS1 en enfermedades autoinmunitarias

CS1 se expresa de forma elevada en células T y B estimuladas, como se compara con las células no estimuladas:

Para determinar la expresión de CS1, se montó un ensayo *in vitro* para estimular linfocitos B y T de sangre periférica, usando como estimulantes el mitógeno derivado de la raíz de *Phytolacca americana* (PWM) y fitohemaglutinina (PHA). Las células mononucleares de sangre periférica del control sin estimular se prepararon en paralelo sin estimulación. Se aisló PolyA⁺ ARNm y se sintetizó ADNc a partir de estas muestras usando técnicas estándar. El gen de CS1 se amplificó mediante PCR usando cebadores oligonucleotídicos específicos de CS1 (véase anteriormente), y la expresión se cuantificó usando Biorad Gel Doc 2000. Las intensidades de las señales se normalizaron a la β-actina humana de control. El análisis de PCR en tiempo real indicó que CS1 mostró un aumento de alrededor de 23 veces en las células B de sangre periférica activadas, y un aumento de alrededor de 30 veces en linfocitos T de sangre periférica activados, en comparación con células sin estimular (Figura 9).

CS1 está aumentada en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con lupus, en comparación con la de adultos sanos de edad parecida:

Para evaluar la expresión de CS1 en pacientes con lupus comparada con individuos sanos, se aislaron linfocitos B de sangre periférica mediante clasificación celular de células CD19⁺ procedentes de paciente con lupus frente a un conjunto de adultos sanos. Se aisló PolyA⁺ ARNm y se sintetizó ADNc usando técnicas estándar. La expresión de CS1 se evaluó mediante PCR en tiempo real usando cebadores oligonucleótidos específicos para CS1. Los datos de la PCR en tiempo real indicaron que CS1 está aumentada alrededor de 2 veces en linfocitos B procedentes del paciente con lupus, en comparación con los individuos sanos. Con la normalización con β-actina, el gen de CS1 aumentó 2,3 veces en el ADNc de linfocitos B de pacientes con lupus, en comparación con el ADNc de individuos sanos. Cuando se normaliza con cebadores de 18S rRNA, CS1 aumentó 1,8 veces en las

muestras de ADNc respectivas (Figura 10).

Aumento de Ly9 nueva de ratón en células B activadas y células T activadas:

5 Ly9 nuevo de ratón es un ortólogo propuesto de CS1 humana (Tovar *et al.*, Immunogenetics 54: 394-402 (2002)). La expresión de Ly9 nueva de ratón en células B activadas y células T activadas se examinó con PCR en tiempo real. Los datos mostraron que Ly9 nueva de ratón está aumentada en células B activadas y células T activadas.

10 La expresión de Ly9 nueva de ratón se analizó con el sistema de detección de secuencias ABI GeneAmp 5700 (véase el Ejemplo 2). Al normalizar con cebadores de 28S rRNA, el gen de Ly9 se incrementó en 3 veces en el ADNc estimulado con conA, y aumentó 6 veces en ADNc estimulado con LPS, en comparación con ADNc de bazo sin estimular.

Aumento de CSI en tejido de enfermedad inflamatoria del intestino

15 La expresión de la proteína o proteínas moduladoras de IBD en tejido con IBD (tanto enfermedad de Crohn como colitis ulcerosa) frente al tejido normal se determinó en conjuntos de microchip como se describe anteriormente. Los microconjuntos oligonucleótidos se interrogaron con ARNc derivados de múltiples tejidos. Más específicamente, los ARNc se generaron mediante ensayos de transcripción in vitro (IVT) a partir de nueve muestras de IBS y nueve muestras de intestino normal adyacentes equivalentes, y 24 muestras epiteliales colónicas. La hibridación de ARNc a los microconjuntos oligonucleótidos se midió mediante la intensidad de fluorescencia media (AI), que es directamente proporcional al nivel de expresión del gen.

20 Los datos se analizaron comparando los niveles de expresión génica en tejidos y órganos de adultos con IBD frente a no patogénicos. Uno de los genes identificados con un incremento significativo en la expresión génica en el tejido de la enfermedad inflamatoria del intestino comparado con el tejido normal es CS1. La Figura 11 es una representación gráfica del análisis del microconjunto, que muestra que la expresión génica de CS1 aumentó en colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn en comparación con células epiteliales colónicas de adulto sano. Para evaluar adicionalmente la expresión de CSI en pacientes con enfermedad inflamatoria del intestino en comparación con individuos sanos, se disgregaron muestras procedentes de secciones enfermas de intestino grueso de 2 pacientes con enfermedad de Crohn y 3 pacientes con colitis ulcerosa frente a muestras de intestino grueso normales procedentes de 3 adultos sanos, se lavaron y se colocaron en TRIZOL®. El ARN total se aisló siguiendo el protocolo del fabricante. El ARN total se trató con ADNasa libre de ARNasa (GenHunter). El ARN digerido con ADNasa se extrajo con fenol/cloroformo, y se precipitó toda la noche con etanol. El ARN se lavó con etanol al 75%, y se disolvió en agua libre de nucleasas. El ARN se cuantificó, y la integridad del ARN se analizó en un gel de agarosa. Los datos de la PCR en tiempo real (Figura 12) indicaron que CS1 está aumentada 7 veces y 6 veces en intestino grueso enfermo procedente de pacientes con enfermedad de Crohn (n = 2) y 13 veces, 14 veces y 46 veces en intestino grueso enfermo procedente de pacientes con colitis ulcerosa (n = 3), en comparación con el intestino normal reunido procedente de individuos sanos (n = 3).

Ejemplo 7: Expresión de CS1 en células de cáncer

Patrón de expresión de la proteína CS1:

45 La expresión de la proteína CS1 se examinó adicionalmente con los anticuerpos Luc producidos a través del análisis FACS. Las estirpes celulares se incubaron con anticuerpos Luc90.H1 anti-CS1 con anticuerpos de control de isotipo IgG2b de ratón durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron con PBS, y se añadieron a las células anti-Ig de ratón conjugado con ficoeritrina (PE) y se incubó durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y se analizaron mediante citometría de flujo en un FACS Caliber (Becton Dickinson). Las gráficas de histogramas se muestran en la Figura 13, en la que se muestra la señal procedente de los anticuerpos Luc90.H1 como la línea en negrita que solapa. Las líneas subyacentes incluyen controles negativos (células sin teñir, anticuerpo secundario (anti-Ig de ratón-PE sin anticuerpo primario), o anticuerpo de control de isotipo). Estos datos muestran que CS1 es expresada en las células de la línea de leucemia ARH-77, en las estirpes celulares de linfoblastoides B IM9 y CESS, y en estirpes celulares de mieloma L363, LP1, y OPM2.

55 Las muestras procedentes de pacientes con mieloma múltiple (n = 21 muestras de médula ósea), de pacientes con MGUS (gammopatía monoclonal de significancia desconocida; n = 1), un paciente con leucemia de células plasmáticas (n = 1), células madre CD34+ movilizadas de médula ósea (n = 5), células de médula normales (n = 3), tejido de ganglios linfáticos normal (n = 1), pacientes con leucemia linfoblástica crónica (CÉLULA; n = 15), pacientes con leucemia mielogenosa aguda (AML; n = 11), un paciente con linfoma no de Hodgkin (NHL; n = 1), y un paciente con linfoma de Hodgkin (n = 1) se incubaron con anticuerpos conjugados a FITC anti-CS1 (Luc90 o Luc63), CD45-PerCP, CD38-PE, y/o CD138-PE, y se procesaron como se detalla anteriormente para el análisis de células de mieloma mediante FACS (véase la Figura 14). Los anticuerpos anti-CS1 de ratón usados aquí son Luc90 (IgG₂b), Luc63 (IgG₂a), Luc38 (IgG₂b), y otros anticuerpos Luc anti-CS1 producidos. Los anticuerpos de control de isotipo fueron anticuerpos anti-IgG de ratón emparejados en isotipo.

Se obtuvieron aspirados de médula ósea procedentes de paciente con mieloma múltiple del Cleveland Clinic. Las estirpes celulares de mieloma (LP1, L363, OPM2, NCI-H929, RPMI 8226, y U266 B1), la estirpe celular de leucemia ARH-77, las líneas linfoblastoides B (IM9, CESS), y las células de médula ósea se tiñeron con anticuerpos monoclonales anti-CS1 frente a anticuerpos de control de isotipo (Becton Dickinson) siguiendo un protocolo de tinción estándar. Las células se lavaron, se colocaron en tampón de tinción (RPMI, 10% de FBS para células humanas, o DMEM, 10% de FBS), y se añadieron anticuerpos anti-CS1 frente a anticuerpos de control de isotipo a 0,5-1 ug de anticuerpo por millón de células en un volumen de 0,1 ml. Para las muestras de pacientes, los glóbulos rojos se lisaron, y las células se peletizaron en una centrifugadora y se resuspendieron en tampón de tinción. Para los anticuerpos que no se conjugaron directamente a FITC, se añadieron anticuerpos en una segunda etapa a 0,5-1 ug de anticuerpo por millón de células en un volumen final de 0,1 ml. Las células se lavaron y se resuspendieron en tampón de tinción para el análisis mediante FACS en un Becton Dickinson FACSCaliber usando el software CellQuest. Para distinguir las células plasmáticas, se tiñeron células de médula ósea con mieloma múltiple con anticuerpos monoclonales anti-CD45, anti-syndecan-1 (CD138), y anti-CD38. Anti-syndecan-1 (CD138) tiñe específicamente células plasmáticas y no otros leucocitos.

Los resultados muestran que CS1 está muy expresada en células plasmáticas (por ejemplo células CD138+) de pacientes con mieloma múltiple (Figuras 14A-14H), células plasmáticas procedentes de un paciente con leucemia de células plasmáticas (Figura 14I), y en varias estirpes celulares de mieloma (L363, LP1, y OPM2; véase la Figura 13). Se ha evaluado un total de 21 muestras de médula ósea diferentes procedentes de pacientes con mieloma múltiple mediante flujo, y, para 21 de las 21 muestras, virtualmente todas las células plasmáticas de la médula ósea expresaron CS1. CS1 también está expresada en células de leucemia ARH-77 y en estirpes celulares linfoblastoides B (IM9 y CESS) (véase la Figura 13).

Ejemplo 8 – Expresión de CS1 en células plasmáticas de paciente con mieloma

Las muestras de médula ósea procedentes de un paciente con mieloma múltiple se tiñeron con CD138-PE, CD45PerCP, Luc90-FITC, y/o IgG2b-FITC (anticuerpo de control de isotipo), y se analizaron mediante FACS como se detalla anteriormente (véase el Ejemplo 5). Las células encerradas son las siguientes: el recinto R1 contiene linfocitos ("R1"), el recinto R2 contiene monocitos ("R2"), el recinto R3 contiene granulocitos ("R3"), el recinto R4 contiene células eritroides ("R4"), el recinto R5 contiene células plasmáticas ("R5"), y el recinto R6 contiene blastos ("R6"). La Figura 15 muestra que CS1 está expresada en células plasmáticas (por ejemplo células CD138+) del paciente con mieloma múltiple.

Ejemplo 9: El anticuerpo monoclonal anti-CS1 disminuye la secreción de IgM por las células B de sangre periférica activadas

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica de un adulto normal mediante un gradiente de Ficoll estándar, se incubaron con mitógeno obtenido de la raíz de *Phytolacca americana* a 10 µg/ml (GIBCO/BRL, Inglaterra, Reino Unido), y se colocaron en una placa de 24 pocillos en un volumen total de 1 ml. Se añadió anticuerpo monoclonal (anti-CS1 humana de ratón (Luc63) o de control de isotipo IgG de ratón) a pocillos de muestras a 100 µg/ml o 10 µg/ml. Las células y el anticuerpo se incubaron a 37°C en 7% de CO₂ durante 8 días. Los sobrenadantes de los cultivos se aislaron, y se ensayó la IgM mediante ELISA como se describe anteriormente. Como se muestra en la Figura 16, el anticuerpo Luc63 a 100 µg/ml o 10 µg/ml (PwLuc100 y PwLuc10, respectivamente) disminuyó la secreción de IgM de las células mononucleares de sangre periférica en comparación con la secreción de IgM por las células incubadas con el control de isotipo a 100 µg/ml o 10 µg/ml (Pwlg100 y Pwlg10, respectivamente) o sin anticuerpo (Pw(-)).

El anticuerpo monoclonal anti-CS1 disminuye la secreción de IgM por las células B de sangre periférica activadas de pacientes con enfermedad autoinmunitaria:

Los sobrenadantes procedentes de los cultivos celulares de células mononucleares de sangre periférica se aislaron como se detalla anteriormente y se evaluaron mediante ELISA. Placas Immulon-1 se revistieron con 100 µl de 1 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IgM humana de ratón (número de catálogo 05-4900, Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, California) en PBS. Las placas se bloquearon durante 1 hora con tampón de ELISA ("EB" = PBS + 0,1% de BSA + 0,05% de Tween 20). Los sobrenadantes del cultivo se añadieron a diversas diluciones (en EB) a 100 µl/pocillo. Los sobrenadantes y la IgM humana estándar (número de catálogo 009-000-012, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine) se incubaron durante 1-2 horas a temperatura ambiente. La IgM humana capturada se desarrolló con anticuerpo policlonal conjugado con HRP anti-IgM humana de cabra (número de catálogo 2020-05, Southern Biotech Association, Birmingham, Alabama) y sustrato HRP, siguiendo el protocolo del fabricante. La IgM unida se visualizó mediante espectrofotometría (DO 405 nm) en un lector de placas de ELISA estándar. Como se muestra en la Figura 17, la cantidad de la IgM segregada de las PBMC de pacientes con lupus se redujo mediante el tratamiento con anticuerpos anti-CS1 (Luc90H1), en comparación con el control de isotipo. Un anticuerpo anti-CD2 de control positivo (GLO1) mostró que el anti-CS1 es incluso más robusto reduciendo la producción de IgM que el anticuerpo anti-CD2.

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

5 La producción de IgG mediante las células B de sangre periférica procedentes de adultos sanos y pacientes con enfermedad autoinmunitaria (lupus) se analizó de la misma manera que la producción de IgM. Como se muestra en la Figura 18, la producción total por células mononucleares de sangre periférica de adultos sanos, 9 días después del tratamiento con el anticuerpo anti-CS1 (Luc90H.1), disminuyó alrededor de 23% en comparación con el control de isotipo IgG2b. La producción total de IgG por las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con lupus, 9 días después del tratamiento con anticuerpo anti-CS1 (Luc90H.1), disminuyó alrededor de 56% en comparación con el control de isotipo IgG2b. Las Tablas 3A y B resumen la inhibición de la producción de IgG por un número de anticuerpos anti-CS1 generados. Como se muestra en la Tabla 3A, Luc90H.1 redujo en alrededor de 40% la producción de IgG por las PBMC activadas con lipopolisacárido o con mitógeno de raíz de *Phytolacca americana*. Luc34.1 redujo en alrededor de 38% la producción de IgG por las PBMC activadas con mitógeno procedente de raíz de *Phytolacca americana*. Como se muestra en la Tabla 3B, Luc 90.H1 redujo la producción de IgG de las PBMC de un adulto sano y una estirpe celular B madura (células IM9) en alrededor de 48%. Luc 34.1 redujo la producción de IgG de las PBMC del adulto sano en alrededor de 53%. Luc 63.2 redujo la producción de IgG de las PBMC y células IM9 en alrededor de 47%. A partir de estos experimentos, es evidente que Luc 90H.1, Luc34.1, y Luc 63.2 son los mejores anticuerpos funcionales. Del cartografiado epitópico, Luc90 y Luc63 tienen epítomos que no solapan.

20 TABLA 3A. ANTI-CS-1 DISMINUYE LA PRODUCCIÓN DE IG

Células B Activadas <i>In Vitro</i>		
Porcentaje Medio de Disminución en Comparación con el Control de Isotipo		
PBMC Activadas <i>In Vitro</i>	MAB ANTI-CS-1	% Medio de Disminución HulgG ± SE
Lipopolisacárido	Luc 90.H1	41% ± 8% (n = 3)
Mltógeno procedente de <i>Phytolacca americana</i>	Luc 90.H1	39% ± 9% (n = 4)
Mltógeno procedente de <i>Phytolacca americana</i>	Luc 34.1	38% ± 7% (n = 4)

25 Tabla 3B. Sumario de los ensayos de producción de IG con el panel de anticuerpos anti-CS-1

PORCENTAJE DE CAMBIO MEDIO EN IG COMPARADO CON EL CONTROL DE ISOTIPO				
Mab ANTI-CS1	Donante 55 de PMBC	Donante 705 de PMBC	IM9	Porcentaje de Cambio Medio en Ig
Luc90H.1	-44%	-56%	-43%	-48%
Luc37	+11%	-43%	-11%	-14%
Luc23	-13%	-4%	+6%	-4%
Luc63.2	-55%	-51%	-36%	-47%
Luc34.1	-64%	-49%	-45%	-53%
Luc38.1	-22%	-44%	-21%	-29%
Luc29D6	-43%	-44%	-25%	-37%

Disminución Relativa en la Producción de Ig:
Grupo A (>45% de disminución): Luc 90, 63, 34
GRUPO B (29-37% DE DISMINUCIÓN): LUC38, 29D6
GRUPO C (4-14% DE DISMINUCIÓN): LUC 37, 23

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

Ejemplo 10: Reducción *in vitro* de IgG mediante anticuerpos monoclonales anti-CS1 en un modelo de ratón SCID-HuPBMC

35 *Modelo de ratón SCID-HuPBMC*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) mediante gradientes de densidad de Ficoll-paque (Amersham Biosciences) estándar, y se resuspendieron en disolución tamponada con fosfato (PBS) a 2×10^7 PBMC/ml. Las PBMC resuspendidas (1 ml) se inyectaron intraperitonealmente (i.p.) en ratones C.B-17 SCID. Dos a tres semanas después de la inyección de las PBMC, se extrajeron muestras de suero de los ratones y se evaluaron para determinar la IgG humana mediante ELISA. Los ratones injertados (que producen >1 µg/ml de IgG humana en suero) se distribuyeron al azar en grupos de tratamiento, y después se trataron con anticuerpos monoclonales anti-CS-1 humana de ratón (Luc90.H1 o Luc63.2.22), anticuerpos de control de isotipo de ratón (IgG2b o IgG2a, respectivamente), o PBS. A los ratones se les dosificó 200 µg de anticuerpo en 500 µl de PBS cada 3-4 días, con 3 o 4 dosis de anticuerpo. El suero de los ratones se analizó para determinar la IgG humana mediante ELISA usando protocolos estándar.

El porcentaje de cambio en IgG humana sérica se calculó para cada ratón restando la concentración de IgG humana antes de la primera dosis de anticuerpo (día 0) de la concentración de IgG humana después de la dosis (día x), dividiendo entre la concentración de IgG humana antes de la primera dosis (día 0), y multiplicando por 100, por ejemplo [(día x – día 0)/día 0] X 100. Se muestran datos como el porcentaje de cambio medio con el error estándar para cada grupo de ratones. Las concentraciones de IgG humana son la concentración media con el error estándar para cada grupo de ratones. Para comparar el porcentaje de cambio en IgG humana a lo largo de grupos de tratamiento, se usó la prueba de la t de 2 muestras de Welch.

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

Los datos muestran que los anticuerpos anti-CS1 de la presente invención reducen sustancialmente la producción de inmunoglobulina humana en el modelo de transferencia de SCID-HuPBMC. Como se muestra en la Figura 19A, Luc90.H1 mantiene el incremento en la producción de IgG en el control de PBS y de isotipo tan pronto como en el Día 4 (4 días después del tratamiento con la primera dosis del anticuerpo). Esta reducción continuó a lo largo de las 7 semanas (Día 32) del período de ensayo. Por ejemplo, en el Día 18, la producción de IgG humana aumentó en 225% en el control de isotipo IgG2b, en 181% en el control de PBS, mientras que la producción de IgG humana disminuyó 14% con el tratamiento con Luc90H.1. Luc90H.1 no sólo abolió el incremento de 185-225% en la producción de IgG humana en los grupos de control, sino también dio como resultado una disminución adicional de 14% en la producción de IgG. En el Día 25, Luc90H.1 no sólo abolió el incremento de 3 veces en la producción de IgG humana en los grupos de control, sino también dio una disminución adicional de 24% en la producción de IgG humana.

Luc 63.2 también redujo efectivamente la producción de IgG *in vivo*. Como se muestra en la Figura 19B, Luc63.2 abolió el incremento de 37-46% en la producción de IgG humana en los grupos de control (control de PBS y de isotipo IgG2a), y dio lugar a una disminución adicional de 59% en la producción de IgG. En este mismo estudio, Luc90.H1 se comparó con Luc63.2, y Luc90.H1 abolió el incremento de 37-114% en los grupos de control (control de PBS y de isotipo IgG2b), y dio una disminución adicional de 14% en la producción de IgG por ratones injertados con células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC).

La Figura 19C resume adicionalmente la reducción en la producción de IgG por el tratamiento con Luc90 y Luc63 en el modelo SCID-HUPBMC. A la vez que anula el incremento de la producción de IgG en ratones tratados con controles de isotipo y de PBS, Luc90 provocó una disminución adicional en la producción de IgG de 14%, 22%, 24%, y 39%, y Luc63 tuvo una disminución adicional de 40% y 59%. De este modo, se puede concluir que el tratamiento con anti-Luc de ratones SCID injertados con las PBMC humanas (SCID-HuPBMC) no sólo anula completamente el incremento de inmunoglobulina humana observado normalmente en el suero de estos animales, sino también da una disminución adicional en comparación con los niveles de pretratamiento.

40 **Ejemplo 11: Actividades ADCC de anticuerpos anti-CS1**

Preparación de células efectoras:

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) (células efectoras) a partir de sangre completa usando gradientes de densidad estándar Ficoll-Paque (Amersham Biosciences). Las células se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con 1% de seroalbúmina bovina (BSA).

Preparación de células diana:

Las células transfectantes estables que expresan CS-1 de superficie celular (células diana) se lavaron y se resuspendieron en medio RPMI suplementado con un 1% de BSA. Las células se colocaron en placas a 100.000 células/placa en un volumen total de 50 µl. Se añadieron a diversas concentraciones a las células diana, en un volumen final de 100 µl, anticuerpos monoclonales anti-CS-1 humana de ratón (Luc90.H1 o Luc63.2.22) o anticuerpos de control de isotipo (IgG2b o IgG2a de ratón, respectivamente), y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente.

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

Ensayo de lactato deshidrogenasa:

Para determinar la actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) contenida en los sobrenadantes, se añadieron a cada pocillo 100 µl de mezcla de reacción procedente del kit de detección de citotoxicidad (Roche Applied Science, Indianápolis, IN), y las muestras se incubaron durante un tiempo de hasta 30 minutos a 15-25°C.

Durante este período de incubación, la placa de microtitulación se protegió de la luz. La observancia de las muestras se midió a 490 nm usando un lector de ELISA.

5 Para determinar el porcentaje de citotoxicidad mediada por las células, se calculó la absorbancia media de las muestras, y se restaron los controles de fondo usando la ecuación siguiente:

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

10 SR: Liberación espontánea
MR: Liberación máxima

Los controles experimentales se liberaron espontáneamente de las células diana solas o las células efectoras solas. Las células diana se ensayaron en disolución de 2% de Triton-X 100 (1:1):

15 *Los anticuerpos anti-CS1 inducen citotoxicidad derivada de anticuerpos (ADCC)*

20 El experimento mostró que los anticuerpos Luc63.2 y Luc90 anti-CS1 indujeron citotoxicidad derivada de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CS1 en presencia de las PBMC (las células efectoras). Como se muestra en la Figura 20, Luc90 induce citotoxicidad de manera dependiente de la dosis. Una cantidad de 50 µg/ml de Luc90 indujo casi 50% de citotoxicidad de las células diana. Luc63.2 generalmente indujo una citotoxicidad de 60-80% de las células diana con un intervalo de dosis de 10-50 µg/ml. Se obtuvieron resultados similares a partir de experimentos realizados con dos donantes adicionales.

25 **Ejemplo 12: Actividad de ADCC con anticuerpos anti-CS1 con bajo contenido de fucosa**

Clonación de los ADNc de la región variable de Luc90

30 Las regiones variables murinas (secuencia ID nº 3 y nº 4) se clonaron a partir de la estirpe celular de hibridoma Luc90 con métodos estándar. De forma breve, se extrajo ARN total y se sintetizó ADNc bicatenario usando el kit de amplificación de ADNc SMART 5'-RACE (BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo el protocolo del proveedor. Los fragmentos de la PCR de los ADNc de la región variable se clonaron en el vector pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) para la determinación de las secuencias. Se secuenciaron varios clones plasmídicos para cada una de las cadenas pesada y ligera. Se identificaron secuencias únicas, homólogas a las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de ratón típicas.

35 *Construcción de vectores de expresión de VH y VL de Luc90 quiméricos*

40 Se diseñó un gen que codifica cada una de VH y VL de Luc90 como un minixón que incluye un péptido señal, una señal donante de corte y empalme, una secuencia de iniciación de Kozak y sitios de enzimas de restricción apropiados para la clonación subsiguiente en un vector de expresión de mamífero. Se diseñaron cebadores para que contuviesen los sitios de restricción apropiados y la complementariedad para PCR a partir de los vectores TOPO que contienen los genes de VH o VL. Los fragmentos amplificados mediante PCR se purificaron mediante el kit de purificación mediante PEC Qiaquick (Qiagen), y se digirieron con Mlul y Xbal. El gen de VH de Luc90 se subclonó en pHuHCg1.D (tipo salvaje) o pHuHCg1.D.AA (mutante BS), para crear los plásmidos pChiHuHCg1.D-MuLuc90VH y pChiHuHCg1.D.AAMuLuc90VH, respectivamente. El mutante BS contiene dos cambios de aminoácidos (L234A/L235A) en la región CH2 de IgG1, de manera que se abolió la unión a los receptores Fc (Xu *et al.*, (2000) Cell Immunol. 200:16-26). El gen de VL de Luc90 se subclonó en pVK para crear el plásmido pChiVk-MuLuc90VL. Se crearon vectores de expresión plasmídicos individuales de manera que los genes de las cadenas pesada y ligera se pudieran expresar a partir de un solo plásmido. Los vectores de la cadena pesada se digirieron con EcoRI para eliminar toda la región de la cadena pesada, y se subclonaron en el sitio EcoRI individual en el vector de la cadena ligera. La cadena pesada del mutante BS se combinó con el fragmento del vector pChiVk-MuLuc90VL para crear el plásmido pChiLuc90-BSK, mientras que la cadena pesada de tipo salvaje se subclonó en el vector pChiVk-MuLuc90VL para crear el plásmido pChiLuc90-g1K.

55 *Expresión de Luc90 quimérico*

60 Se produjeron anticuerpos de tipo salvaje y BS de IgG1/κ de Luc90 quiméricos mediante transfección estable de células Sp2/0 con los vectores pChiLuc90-g1K y pChiLuc90-BSK, respectivamente. Se produjo un anticuerpo con bajo contenido de fucosa mediante transfección estable de células YB2/0 con el vector pChiLuc90-g1K. Los clones positivos se seleccionaron con medio ácido micofenólico, y se identificaron mediante ELISA. El clon de tipo salvaje AH4, el mutante BS HG12 y el clon con un bajo contenido de fucosa 5E4 se seleccionaron para la expresión elevada, se adaptaron a medio libre de suero de hibridoma Gibco con 2% de suero fetal bovino bajo en Ig. Se hicieron crecer dos litros de cultivos en botellas giratorias para la purificación. Los anticuerpos se purificaron mediante cromatografía en columna de afinidad de proteína G estándar.

Las Figuras 21A-C representan datos sobre el efecto de los anticuerpos con bajo contenido de fucosa en los ensayos de citotoxicidad. Las células que expresan CS1 (estirpes celulares de mieloma múltiple humano y transfectantes estables) se trataron con anticuerpos quiméricos Luc90 anti-CS1 (tanto de tipo salvaje como anticuerpos modificados con niveles reducidos de fucosa). Los anticuerpos quiméricos Luc90 anti-CS1 estimulan la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células que expresan CS1. (La Figura 21A muestra la citotoxicidad de una estirpe celular estable que expresa CS1 humana; las Figuras 21B y 21C representan la citotoxicidad de dos estirpes celulares de mieloma humano, OPM2 (Figura 21B) y L363 (Figura 21C). En cada caso, la citotoxicidad está aumentada significativamente con los anticuerpos que tienen niveles bajos de fucosa (a través del crecimiento en células YB2/0 como se detalla anteriormente).

Ejemplo 13: Tratamiento de mieloma con anticuerpos anti-CS1

El tratamiento con anticuerpo anti-CS1 *in vivo* se llevó a cabo en un modelo de tumor de mieloma de ratón inyectando intraperitonealmente anticuerpo en el sujeto de ensayo. Como se muestra en la Figura 22, el tratamiento con anticuerpos anti-CS1 (Luc63 y Luc90) disminuye el tamaño tumoral en comparación con los animales tratados con el control de isotipo. En este estudio, se inyectaron i.p. 1×10^7 células de mieloma (estirpe celular de mieloma L363) en ratones CB.17 SCID. Dos semanas más tarde, cuando el tamaño tumoral alcanzó $\sim 80 \text{ mm}^3$, los ratones se distribuyeron al azar en 4 grupos con 8 ratones por grupo. Los ratones se trataron con anticuerpos anti-CS1 (Luc63 o Luc90) o con anticuerpos de control de isotipo (IgG2a de ratón o IgG2b de ratón). A los ratones se les dosificaron $200 \mu\text{g}$ de anticuerpo/ratón durante 8 dosis a 3 dosis por semana. Los resultados muestran que los ratones tratados con los anticuerpos anti-CS1 tienen volúmenes tumorales significativamente reducidos en comparación con los ratones tratados con los anticuerpos de control de isotipo. Hacia el día 24 del estudio (después de 5 dosis), los ratones tratados con Luc63 muestran un tamaño medio tumoral $\sim 100 \text{ mm}^3$, en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo de control de isotipo IgG2a (tamaño medio tumoral $\sim 800 \text{ mm}^3$). Los ratones tratados con Luc90 muestran un tamaño medio tumoral $\sim 400 \text{ mm}^3$ en comparación con los ratones tratados con anticuerpo de control de isotipo IgG2b (que tienen un tamaño medio tumoral $\sim 950 \text{ mm}^3$). Los ratones tratados con Luc63 anti-CS1 no tienen tumores medibles hasta 2,5 semanas después del tratamiento, señalando la eficacia sobresaliente del anticuerpo a la hora de eliminar células tumorígenas.

Los sistemas modelo adicionales para mieloma incluyen ratones SCID implantados intravenosamente (i.v.), intraperitonealmente (i.p.) o inyectados directamente en el hueso (ortotópicamente) con estirpes celulares de mieloma marcadas fluorescentemente o no marcadas o estirpes celulares B maduras, por ejemplo ARH77, CESS, IM9, L363, LP1 y OPM2. Estas estirpes se usarán para ensayar los efectos del tratamiento antagonista en sistemas modelo de animales con mieloma. Estas estirpes celulares expresan el antígeno reconocido por anticuerpos anti-CS1 humana. Los animales se distribuyen al azar en grupos que se someten a un régimen de tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o con anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo). Los anticuerpos se administran a varios niveles de dosificación, por ejemplo una dosis de 1-10 mg/kg durante un total de 9-10 dosis dadas intraperitonealmente cada 3-4 días. El tamaño tumoral se midió dos veces a la semana durante 35-40 días para cada grupo de tratamiento. Se anotaron las manifestaciones clínicas del mieloma. Las fechas de la muerte se registraron para cada ratón.

Los estudios con animales también se iniciarán para determinar la sinergia potencial entre el tratamiento con anticuerpos anti-CS1 y la quimioterapia. Se dejaron crecer tumores de xenoinjerto hasta que alcanzaron un tamaño aproximado entre $50\text{-}100 \text{ mm}^3$, y, para ratones inyectados i.v., i.p., u ortotópicamente, se dejó que las células cancerígenas se injertaran en los animales. En ese momento, los animales se distribuyeron al azar en grupos y se sometieron a un régimen de tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo). Como alternativa, los animales se pueden someter a tratamiento con anticuerpos anti-CS1 humana o con anticuerpos de control (por ejemplo, anticuerpos de control de isotipo) en combinación con agentes quimioterapéuticos estándar, incluyendo combinaciones de prednisona y melfalán u otros agentes alquilantes (por ejemplo ciclofosfamida o clorambucilo), o vincristina, doxorubicina y tratamiento con dosis elevadas de dexametasona (VAD), u otros regímenes de quimioterapia conocidos por aquellos de pericia en la técnica. Los anticuerpos se administran a varios niveles de dosificación, por ejemplo una dosis de 1-10 mg/kg durante un total de 9-10 dosis dadas intraperitonealmente cada 3-4 días. La quimioterapia se administra intraperitonealmente cada 3-4 días a una concentración efectiva, por ejemplo 1 mg/kg u otra dosis efectiva que sea conocida por los expertos en la técnica. El tamaño tumoral (por ejemplo animales inyectados s.c.) se mide dos veces a la semana durante 35-40 días para cada grupo de tratamiento. Se anotan las manifestaciones clínicas del mieloma, incluyendo la inmunoglobulina sérica en ratones inyectados con estirpes celulares que segregan inmunoglobulina humana (IM9, CESS, ARH-77, y LP-1). Las fechas de la muerte se registran para cada ratón. Se evaluará la eficacia de un tratamiento con anticuerpos en presencia y ausencia de quimioterapia.

TABLA 2

SEC ID nº 1

Clave de cebador PDL:433671 Secuencia de ADN

Nº de Acceso de Ácido Nucleico: NM_021181

5 GI:19923571|ref|NM_021181.3|Miembro 7 de la familia SLAM de Homo sapiens (SLAMF7), ARNm

```

1      cttccagaga gcaatatggc tggttcccca acatgectca cctcatcta tatcctttgg
61     cagctcacag ggtcagcagc ctctggacce gtgaaagagc tggtcggttc cgttgggtggg
121    gccgtgactt tccccctgaa gtccaaagta aagcaagttg actctattgt ctggaccttc
181    aacacaaccc ctcttgtcac catacagcca gaagggggca ctatcatagt gacccaaaat
241    cgtaataggg agagagtaga cttcccagat ggaggctact ccctgaagct cagcaaactg
301    aagaagaatg actcagggat ctactatgtg gggatataca gctcatcact ccagcagccc
361    tccacccagg agtacgtgct gcatgtctac gagcacctgt caaagcctaa agtcaccatg
421    ggtctgcaga gcaataagaa tggcacctgt gtgaccaatc tgacatgctg catggaaact
481    ggggaagagg atgtgattta tacctggaag gccctggggc aagcagccaa tgagtcccat
541    aatgggtcca tcctccccat ctctgggaga tggggagaaa gtgatatgac cttcatctgc
601    gttgccagga accctgtcag cagaaacttc tcaagcccca tccttgccag gaagctctgt
661    gaaggtgctg ctgatgacct agattcctcc atggtcctcc tgtgtctct gttgggtgcc
721    ctctgtctca gtctctttgt actggggcta tttctttggt ttctgaagag agagagacaa
781    gaagagtaca ttgaagagaa gaagagagtg gacattgtc gggaaactcc taacatatgc
841    cccattctg  gagagaacac agagtagac acaatcctc  aactaatag aacaatccta
901    aaggaagatc cagcaaatac ggtttactcc actgtggaaa taccgaaaa  gatggaaat
961    cccactcac  tgctcacgat gccagacaca ccaaggctat ttgcctatga gaatgttatc
1021   tagacagcag tgcactcccc taagtctctg ctcaaaaaaa aaacaattct cggcccaaag
1081   aaaacaatca gaagaattca ctgatttgac tagaaacatc aaggaagaat gaagaacgtt
1141   gacttttttc caggataaat tatctctgat gcttctttag atttaagagt tcataatcc
1201   atccactgct gagaaatctc ctcaaaccca gaaggtttaa tcacttcac  ccaaaaatgg
1261   gattgtgaat gtcagcaaac cataaaaaaa gtgcttagaa gtattcctat agaaatgtaa
1321   atgcaaggtc acacatatta atgacagcct gttgtattaa tgatggctcc aggtcagtgt
1381   ctggagtttc attccatccc agggcttggg tgtaaggatt ataccaagag tcttgctacc
1441   aggagggcaa gaagacaaaa acagacagac aagtcagca  gaagcagatg cacctgacaa
1501   aaatggatgt attaattggc tctataaact atgtgccag  cactatgctg agcttacct
1561   aattggtcag acgtgctgtc tgcctcatg  aaattggctc caaatgaatg aactacttc
1621   atgagcagtt gtagcaggcc tgaccacaga tcccgaggg gccaggtgtg gatccacagg
1681   actgaaggt  caaagttcac aaagatgaag aatcagggtg gctgaccatg tttggcagat
1741   attataatgg agacacagaa gtgtgcatgg cccaaggaca aggacctcca gccaggcttc
1801   atttatgcac ttgtgctgca aaagaaaagt ctaggtttta aggctgtgcc agaaccatc
1861   ccaataaaga gaccgagtct gaagtacat  tgtaaatcta gtgtaggaga cttggagtca
1921   ggcagtgaga ctggtggggc acggggggca gtgggtactt gtaaacctt  aaagatggtt
1981   aattcattca atagatattt attaagaacc tatgcccggc ggcatggtgg ctcacacctg
2041   taatcccagc actttgggag gccaaaggtg gtgggtcatc tgaggtcagg agttcaagac
2101   gacctggccc aacatggtga aacccatct  ctactaaaga tacaaaaatt tgctgagcgt
2161   ggtggtgtgc acctgtaatc ccagctactc gagaggccaa ggcatgagaa tcgcttgaac
2221   ctgggaggtg gaggttgtag tgagctgaga tggcaccact gcactccggc ctaggcaacg
2281   agagcaaac  tccaatacaa acaaacaaac aaacacctgt gctaggtcag tctggcacgt
2341   aagatgaaca tcctaccaa  cacagagctc accatctctt atacttaagt gaaaaacatg
2401   ggaaggggga aaggggaatg gctgcttttg atatgttccc tgacacatat cttgaatgga
2461   gacctcccta ccaagtgatg aaagtgttga aaaacttaat aacaaatgct tgttgggcaa
2521   gaatgggatt gaggattatc ttctctcaga aaggcattgt gaaggaatg  agccagatct
2581   ctctccctac tgcaaaaccc tattgtagta aaaaagtctt ctttactatc ttaataaaa
2641   agatattgtg agattcaaaa aaaaaaaaaa aa

```

SEC ID nº 2

10 Secuencia de aminoácido - CS1

GI:19923571|ref|NM_021181.3|Miembro 7 de la familia de SLAM de Homo sapiens (SLAMF7)

```

MAGSPTCLTLIYILWQLTGSAASGPVKELVGSVGGAVTFPLKSKVKQVDSIVWTFNNTPLVTIQPEGGTIIIVT
QNRNRERVDVFDGGYSLKLSKLNKNSGIYYVGIYSSSLQQPSTQYVVLHVYEHLSKPKVTMGLQSNKNGTCV
TNLTCCMEHGEEDVIYTWKALGQAANESHNGSILPISWRWGESDMTFICVARNPVSRRNFSSPILARKLCEGAA
DDPDSMVLCLLLVPLLLSLFVLGLFLWFLKRERQEYIIEKKRVDICRETPNICPHSGENTHEYDTIPIHTNR
TILKEDPANTVYSTVEIPKMKMENPHSLLTMPDTPRIFAYENVI

```

15

Tabla 4: *Secuencias de Aminoácidos de Anticuerpos anti-CS1*

Luc-90 VH – SEC ID nº 3

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYSFTTYWMNWKQRPQGLEWIGMIHPSDSETRLNQ
SEC ID nº 9 SEC ID nº 10
KFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCARSTMIATRAMDYWGQGTSVTVSS
SEC ID nº 11

Luc-90 VL – SEC ID nº 4

DIVMTQSQKSMSTSVGDRVSITCKASQDVITGVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF
SEC ID nº 12 SEC ID nº 13
TGSGSGTDFFTTISNVQAEDLAVYYCQOHYSTPLTFGAGTKLELK
SEC ID nº 14

Luc-63 VH – SEC ID nº 5

EVKLLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKGLEWIGEINPDSSTINYTP
SEC ID nº 15 SEC ID nº 16
SLKDKFIIISRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCARPDGNYWYFDVWGAGTTVTVSS
SEC ID nº 17

Luc-63 VL – SEC ID nº 6

DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGIAWAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRF
SEC ID nº 18 SEC ID nº 19
TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSSYPYTFGGGKLEIK
SEC ID nº 20

Luc-34 VH – SEC ID nº 7

QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGLEWIGAIYPGDGDTRYTQ
SEC ID nº 21 SEC ID nº 22
KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGKVYYGSNPFAYWGQGLVTVSA
SEC ID nº 23

Luc-34 VL – SEC ID nº 8

DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGVPSPRF
SEC ID nº 24 SEC ID nº 25
SGSGSGKDYTLTSLQTEDVATYYCQQYWSTPWTFGGGKLEIK
SEC ID nº 26

TABLA 5: Sitio de Glucosilación Putativo de la Región de la Cadena Pesada Variable de Luc63 anti-CS1

Luc-63 VH (SEC ID nº 27)

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMSWVRQAPGKG

SEC ID nº 29

SEC ID nº 30

LKWIGEDINPDSSTINYP**SLKDKFTI**SRDNAKNTLYLQMSKVRSEDTALYYCAR**PDGNYWYF**

SEC ID nº 31

SEC ID nº 32

DVWGAGTTVTVSS



NYA (SEC ID nº 33)

Luc-63 VL SEC ID nº 28

MEFHSQVFFVYMLLWLSGVEGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGI**AV**

SEC ID nº 34

SEC ID nº 35

ANYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYF

SEC ID nº 36

CQQYSBYFYTFGGGTKLEIK

SEC ID nº 37

5 TABLA 6: Humanización de Luc63 (NYA) – Alineamiento de las regiones VH de MuLuc63 (SEC ID nº 38),
 secuencia de aminoácidos deducida de ADNc de región variable humano (SEC ID nº 39), ADNc de JH1 humano
 (SEC ID nº 40), y HuLuc63 (SEC ID nº 41), y regiones VL de MuLuc63 (SEC ID nº 42), secuencia de
 10 aminoácidos deducida de ADNc de región variable humano (SEC ID nº 43) y huLuc63 (SEC ID nº 44). La CDR2
 de la VH de HuLuc63 es SEC ID nº 95.

HuLuc-63 VH	<u>EVKLL</u> ESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFDFSRYWMS
ADNc de VH humano	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
HuLuc-63 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRYWMS
MuLuc-63 VH	WVRQAPGKGLEWIG <u>KINPDSSTINYP</u> SLKD
ADNc de VH humano	WVRQAPGKGLEWVA
HuLuc-63 VH	WVRQAPGKGLEWIG <u>EINPDSSTINYP</u> SLKD
HuLuc-63 VH	KFIISRDNAKNTLYQMSKVRSEDTALYYCAR
ADNc de JH1 humano	RFTISRDNAKNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
HuLuc-63 VH	<u>KFIISRDN</u> AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
HuLuc-63 VH	<u>PDGNYWYFDV</u> WGAGTTVTVSS
ADNc de JH1 humano	<u>PDGXWYFDV</u> WQQGTLVTVSS
HuLuc-63 VH	<u>PDGNYWYFDV</u> WGAGTTVTVSS
MuLuc-63 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC <u>KASQDVGI</u> AVA
ADNc de VL humano	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
HuLuc-63 VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC <u>KASQDVGI</u> AVA
MuLuc-63 VL	WYQQKPGQSFKLLIY <u>WASTRHT</u>
ADNc de VL humano	WYQQKPGQSFKLLIY
HuLuc-63 VL	WYQQKPGQSFKLLIY <u>WASTRHT</u>
MuLuc-63 VL	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC
ADNc de VL humano	GVPSRFSGSGSQDFTLTISLQFPEKVATYYC

Tabla 9: Oligonucleótidos Usados para la Síntesis del Gen de VH y VL de HuLuc63

Gen de HuLuc63 VH

5	Oligonucleótido 1 (SEC ID nº 53) 5'-TTTACGCGTCCACCATGCATTTTGGGCTGATTT-3'
	Oligonucleótido 2 (SEC ID nº 54) 5'-TTTTTATTGTTGCTCTTTTAAAAGGGGTCCAGTGTGAGGT-3'
10	Oligonucleótido 3 (SEC ID nº 55) 5'-GCAGCTTGTGCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGA-3'
	Oligonucleótido 4 (SEC ID nº 56) 5'-GGATCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCAGGATTCGATT-3'
15	Oligonucleótido 5 5'-TTAGTAGATATTGGATGAGTTGGGTCCGGCAGGCTCCAGG-3'
	Oligonucleótido 6 5'-GAAAGGG CTAGAATGGATTGGAGAAATTAATCCAGATAGC-3'
20	Oligonucleótido 7 5'-AGTACGATAAACTATGCTCCATCTCTAAAGGATAAATTCA-3'
	Oligonucleótido 8 5'-TCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATAGCCTGTACCTGCA-3'
25	Oligonucleótido 9 5'-AATGAACAGCCTCAGAGCTGAGGACACAGCCGTTTATTAC-3'
	Oligonucleótido 10 5'-TGTGCAAGACCGGACGGAACTACTGGTACTTCGATGTCT-3'
30	Oligonucleótido 11 5'-GGGGCCAGGGGACCCCTCGTCACCGTCTCCTCAGGTAAGAA-3'
	Oligonucleótido 12 5'-TTTTCTAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGT-3'
35	Oligonucleótido 13 5'-GACGAGGGTCCCCTGGCCCCAGACATCGAAGTACCAGTAG-3'
	Oligonucleótido 14 5'-TTTCCGTCCGGTCTTGACAGTAATAAACGGCTGTGTCT-3'
40	Oligonucleótido 15 5'-CAGCTCTGAGGCTGTTTATTGACAGGTACAGGCTATTTTT-3'
	Oligonucleótido 16 5'-GGCGTTGTCTCTGGAGATGATGAATTTATCCTTTAGAGAT-3'
45	Oligonucleótido 17 5'-GGAGCATAGTTTATCGTACTGCTATCTGGATTAATTTCTC-3'
	Oligonucleótido 18 5'-CAATCCATTCTAGCCCTTTCCCTGGAGCCTGCCGGACCCA-3'
50	Oligonucleótido 19 5'-ACTCATCCAATATCTACTAAAATCGAATCCTGAGGCTGCA-3'
	Oligonucleótido 20 5'-CAGGAGAGTCTCAGGGATCCTCCAGGCTGCACCAGGCCAC-3'
55	Oligonucleótido 21 5'-CTCCAGACTCGACAAGCTGCACCTCACACTGGACCCCTTT-3'
60	
65	

- Oligonucleótido 22
5'-TAAAAGAGCAACAATAAAAAAATCAGCCCAAATCCATG-3'
- 5 Gen de HuLuc63 VL
- Oligonucleótido A
5'-TTTACGCGTCCACCATGGAGACACATTCTCAGGTCTTTGTATA-3'
- 10 Oligonucleótido B
5'-CATGTTGCTGTGGTTGTCTGGTGTGAAGGAGACATTCAG-3'
- Oligonucleótido C
5'-ATGACCCAGTCTCCTTCATCACTTTCCGCATCAGTAGGAG-3'
- 15 Oligonucleótido D
5'-ACAGAGTCACTATCACCTGCAAGGCCAGTCAGGATGTGGG-3'
- Oligonucleótido E
5'-TATTGCTGTAGCCTGGTATCAACAGAAACCAGGGAAAGTA-3'
- 20 Oligonucleótido F
5'-CCTAACTATTGATTTACTGGGCATCCACCCGGCACACTG-3'
- 25 Oligonucleótido G
5'-GAGTCCCTGATCGATTCTCAGGCAGTGGATCTGGGACAGA-3'
- Oligonucleótido H
5'-TTTCACTCTCACCATTAGCTCACTACAGCCTGAAGACGTG-3'
- 30 Oligonucleótido I
5'-GCAACTTATTACTGTCAGCAATATAGCAGCTATCCATACA-3'
- Oligonucleótido J
5'-CGTTCGGACAGGGGACCAAGGTGGAATCAAACGTAAGTG-3'
- 35 Oligonucleótido K
5'-TTTTCTAGATTAGGAAAGTGCACCTTACGTTTGATTTCCAC-3'
- 40 Oligonucleótido L
5'-CTTGGTCCCCTGTCCGAACGTGTATGGATAGCTGCTATAT-3'
- Oligonucleótido M
5'-TGCTGACAGTAATAAGTTGCCACGTCTTCAGGCTGTAGTG-3'
- 45 Oligonucleótido N
5'-AGCTAATGGTGAGAGTGAAATCTGTCCCAGATCCACTGCC-3'
- Oligonucleótido O
5'-TGAGAATCGATCAGGACTCCAGTGTGCCGGGTGGATGCC-3'
- 50 Oligonucleótido P
5'-CAGTAAATCAATAGTTTAGGTACTTTCCCTGGTTTCTGTT-3'
- 55 Oligonucleótido Q
5'-GATACCAGGCTACAGCAATACCCACATCCTGACTGGCCTT-3'
- Oligonucleótido R
5'-GCAGGTGATAGTACTCTGTCTCCTACTGATGCGGAAAGT-3'
- 60 Oligonucleótido S
5'-GATGAAGGAGACTGGGTCACTGAATGTCTCCTTCAACAC-3'
- Oligonucleótido T
5'-CAGACAACCACAGCAACATGTATACAAAGACCTGAGAATG-3'
- 65

PÁRRAFOS RELEVANTES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, en el que dicho anticuerpo se une a CS1 e inhibe la secreción de inmunoglobulina.
2. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo inhibe la proliferación de leucocitos.
- 10 3. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo inhibe la proliferación de células cancerosas.
- 15 4. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo desencadena los efectos citotóxicos sobre las células que expresan CS1 o aumenta la citotoxicidad mediada por las células inmunitarias.
- 20 5. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo desencadena la citotoxicidad mediada por ADCC de las células que expresan CS1.
6. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo se une a sustancialmente el mismo epítipo que el anticuerpo producido por la estirpe celular de híbridoma que presenta el número de acceso ATCC PTA-5091 o un anticuerpo Luc63.
- 25 7. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es producido por una estirpe celular de híbridoma que presenta el número de acceso PTA-5091.
8. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es producido por una estirpe celular de híbridoma que expresa el anticuerpo Luc63.
- 30 9. El anticuerpo según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
10. El anticuerpo según el párrafo 9, en el que dicho anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo completamente humano.
- 35 11. El anticuerpo según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo es conjugado con un agente citotóxico.
12. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo se une sustancialmente al mismo epítipo que un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID nº: 3-26.
- 40 13. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID nº: 3-26.
- 45 14. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 13, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 3 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 4.
- 50 15. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 13, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 5 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 6.
- 55 16. El anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno según el párrafo 13, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 7 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 8.
17. Una región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR) de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 9, 10, 11, 15, 16, 17, 21, 22 o 23.
- 60 18. Una región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR) de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 12, 13, 14, 18, 19, 20, 24, 25 o 26.
- 65 19. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEC ID nº: 27-44.
20. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno según el párrafo 19, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº 27 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 28.

21. Un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno, en el que dicha región variable de cadena pesada comprende una CDR de SEC ID nº: 33.
- 5 22. Una región determinante de complementariedad de cadena pesada (CDR) de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 29, 30, 31, 32 o 33.
23. Una región determinante de complementariedad de cadena ligera (CDR) de un anticuerpo que comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID nº: 34, 35, 36 o 37.
- 10 24. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéutico y el anticuerpo según el párrafo 1.
25. Un procedimiento de inhibición de la proliferación de las células que expresan CS-1 que comprende poner en contacto dichas células con una cantidad efectiva de un antagonista de CS1.
- 15 26. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dichas células que expresan CS-1 son células cancerosas de las células plasmáticas.
- 20 27. El procedimiento según el párrafo 26, en el que dichos cánceres de células plasmáticas son seleccionados de entre el grupo que consiste en mieloma múltiple, mieloma óseo, plasmacitoma extramedular, macroglobulinemia (que incluye la macroglobulinemia de Waldenström), enfermedad de cadena pesada, amiloidosis primaria y gammapatía monoclonal de significancia desconocida.
- 25 28. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dichas células que expresan CS-1 proceden de células cancerosas de células no plasmáticas.
29. El procedimiento según el párrafo 28, en el que dicho cáncer de células no plasmáticas es la leucemia linfocítica crónica.
- 30 30. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dichas células que expresan CS-1 proceden de leucocitos.
31. El procedimiento según el párrafo 30, en el que dichos leucocitos son linfocitos B o T activados.
32. El procedimiento según el párrafo 31, en el que dichos leucocitos proceden de un paciente que padece SLE.
- 35 33. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dicho antagonista inhibe la secreción de inmunoglobulina.
34. El procedimiento según el párrafo 33, en el que dicha inmunoglobulina es la IgG o la IgM.
- 40 35. El procedimiento según el párrafo 34, en el que dicho antagonista es una proteína que interactúa directamente con CS1.
36. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dicha proteína es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno que se une a CS1.
- 45 37. El procedimiento según el párrafo 36, en el que dicho anticuerpo es monoclonal.
38. El procedimiento según el párrafo 37, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo completamente humano.
- 50 39. El procedimiento según el párrafo 37, en el que dicho anticuerpo es conjugado con un agente citotóxico.
40. El procedimiento según el párrafo 37, en el que dicho anticuerpo presenta unos niveles reducidos de fucosa o está mutado para aumentar la afinidad de anticuerpo para un receptor FcγR.
- 55 41. El procedimiento según el párrafo 37, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por una estirpe celular de hibridoma que presenta un número de acceso ATCC PTA-5091.
42. El procedimiento según el párrafo 37, en el que dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal producido por una estirpe celular de hibridoma que expresa Luc63.
- 60 43. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dicho antagonista inhibe la expresión proteínica de CS1.
44. El procedimiento según el párrafo 25, en el que dicho antagonista es un ácido nucleico antisentido de una secuencia de ácidos nucleicos que codifica CS1 o una parte del mismo.
- 65

45. Un procedimiento para inhibir la secreción de inmunoglobulina que comprende administrar un antagonista que se une específicamente a un polipéptido codificado por la SEC ID n°: 2.
- 5 46. Un procedimiento para tratar a un individuo con cáncer de células plasmáticas que comprende administrar un antagonista que se une específicamente a un polipéptido codificado por la SEC ID n°: 2.
47. El procedimiento según el párrafo 46, en el que dicho antagonista es el anticuerpo del párrafo 1.
- 10 48. El procedimiento según el párrafo 46, en el que dicho anticuerpo presenta unos niveles reducidos de fucosa o está mutado para aumentar la afinidad de anticuerpo para el receptor FcγR.
49. El procedimiento según el párrafo 46, en el que dicho cáncer de células plasmáticas es el mieloma o el mieloma múltiple.
- 15 50. Un procedimiento para tratar a un individuo con la enfermedad inflamatoria intestinal que comprende administrar un antagonista que se une específicamente a un polipéptido codificado por la SEC ID n°: 2.
- 20 51. Un procedimiento para aumentar la actividad de ADCC del anticuerpo según el párrafo 1, en el que dicho anticuerpo presenta unos niveles reducidos de fucosa o está mutado para aumentar la afinidad de anticuerpo para el receptor FcγR.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID nº: 1, para su utilización en el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado manifestaciones clínicas del mieloma.
2. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su utilización en el tratamiento de un mieloma según la reivindicación 1, que inhibe la secreción de inmunoglobulina.
- 10 3. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su utilización en el tratamiento de un mieloma según la reivindicación 1 o 2, que induce la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC") de las células que expresan dicha proteína codificada por SEC ID nº: 1.
- 15 4. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su utilización en el tratamiento de un mieloma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que induce una citotoxicidad de por lo menos 40%, preferentemente una citotoxicidad de por lo menos 60%, de las células que expresan dicha proteína codificada por la SEC ID nº: 1.
- 20 5. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su utilización en el tratamiento de un mieloma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que es administrado asimismo un fármaco inmunosupresor al paciente.
- 25 6. Anticuerpo o fragmento de unión a antígeno para su utilización en el tratamiento de un mieloma según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que es administrado asimismo un inmunomodulador al paciente.
- 30 7. Utilización de un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID nº: 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado manifestaciones clínicas del mieloma.
- 35 8. Utilización de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno según la reivindicación 7, y definido además por la característica específica según una o más de las reivindicaciones 2 a 6.
9. Compuesto conjugado que comprende un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista, ligado a un resto efector, y preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID nº: 1, para su utilización en el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma.
- 40 10. Compuesto conjugado para su utilización según la reivindicación 9, en el que el resto efector es un agente citotóxico.
- 45 11. Compuesto conjugado para su utilización según la reivindicación 9, en el que el resto efector es un resto de detección, un resto activable, un agente quimioterápico, una lipasa, un antibiótico, un agente quimiotáctico, un modulador inmunitario o un radioisótopo.
- 50 12. Compuesto conjugado para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que es administrado asimismo un fármaco inmunosupresor al paciente.
- 55 13. Compuesto conjugado para su utilización según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, en el que es administrado asimismo un inmunomodulador al paciente.
14. Utilización de un compuesto conjugado que comprende un anticuerpo anti-CS1 monoclonal antagonista o un fragmento de unión a antígeno anti-CS1 antagonista ligado a un resto efector, y preferentemente humanizado, que se une a una proteína codificada por SEC ID nº: 1, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mieloma en un paciente que no ha desarrollado las manifestaciones clínicas del mieloma.
15. Utilización de un compuesto conjugado según la reivindicación 14 y que se define además por las características específicas según una o más de las reivindicaciones 10 a 13.

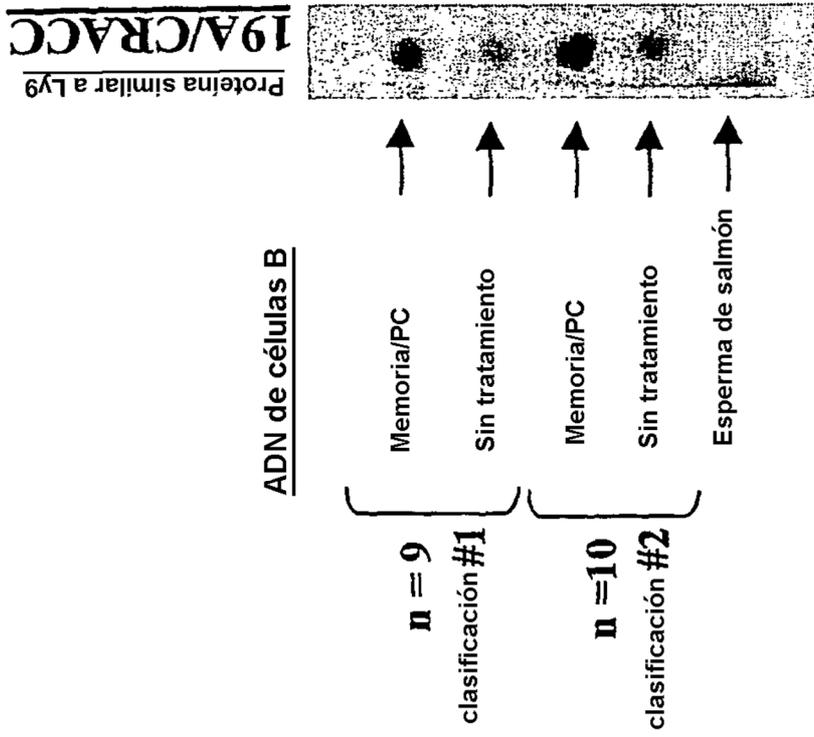


FIG. 1A

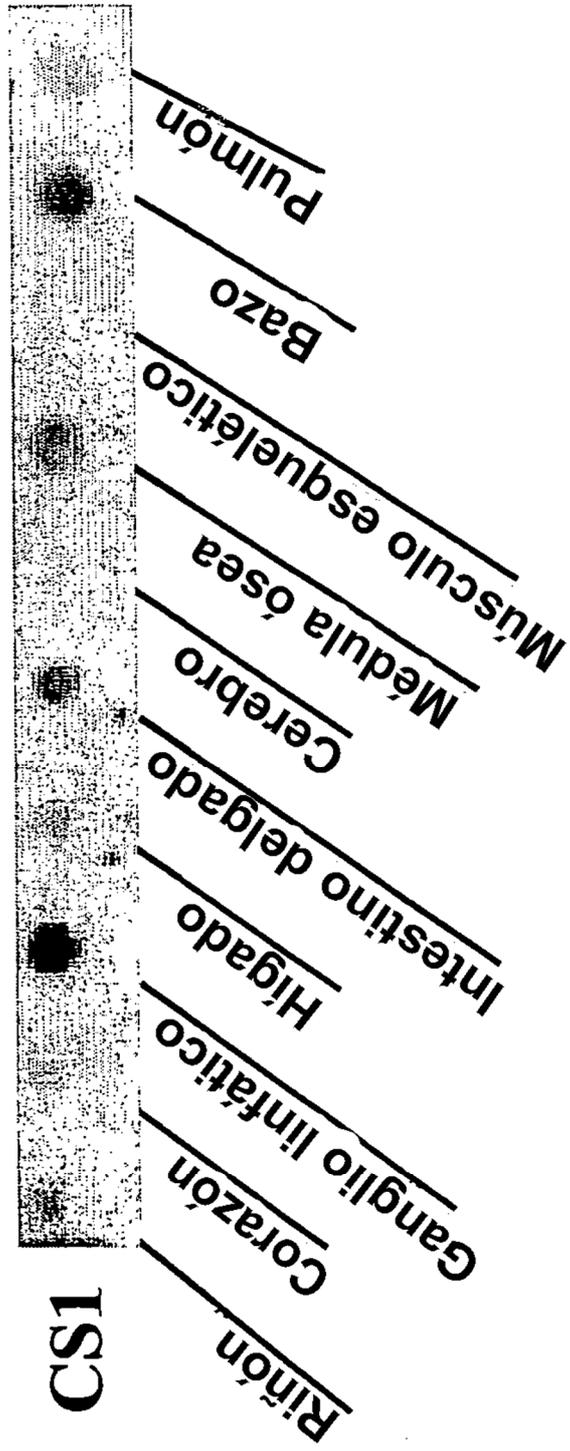


FIG. 1B

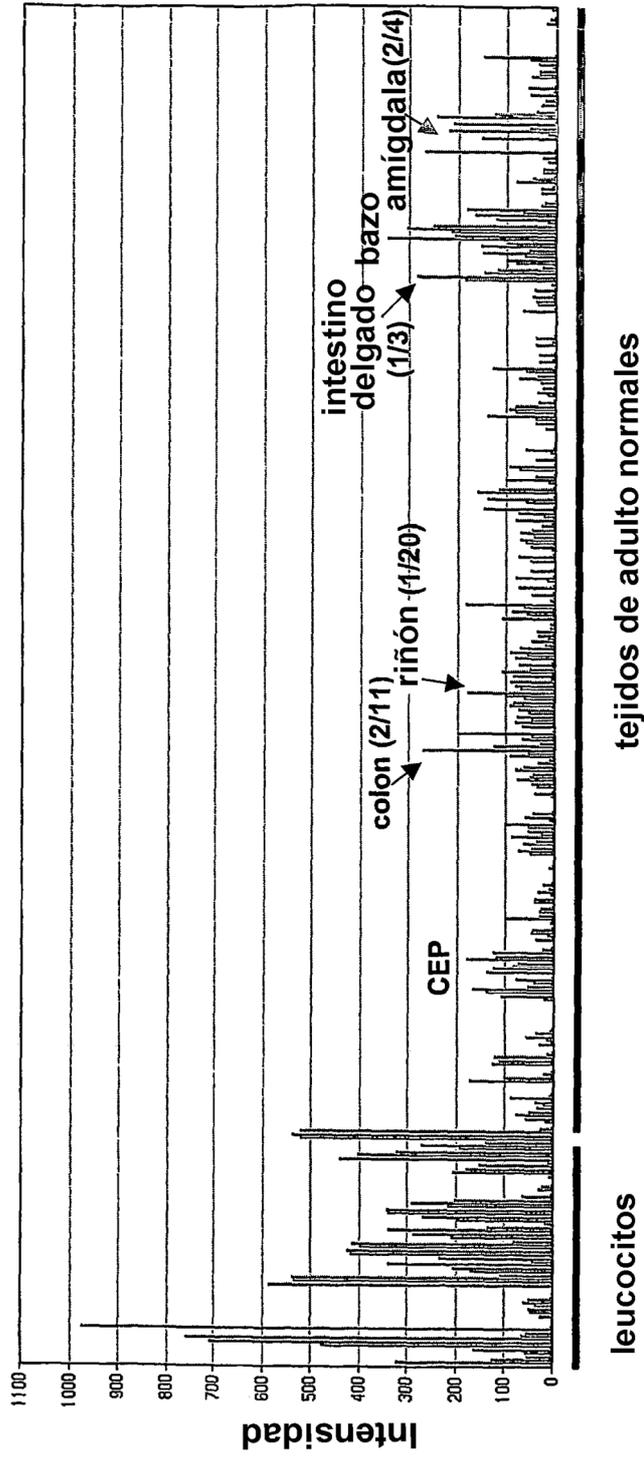


FIG. 2A

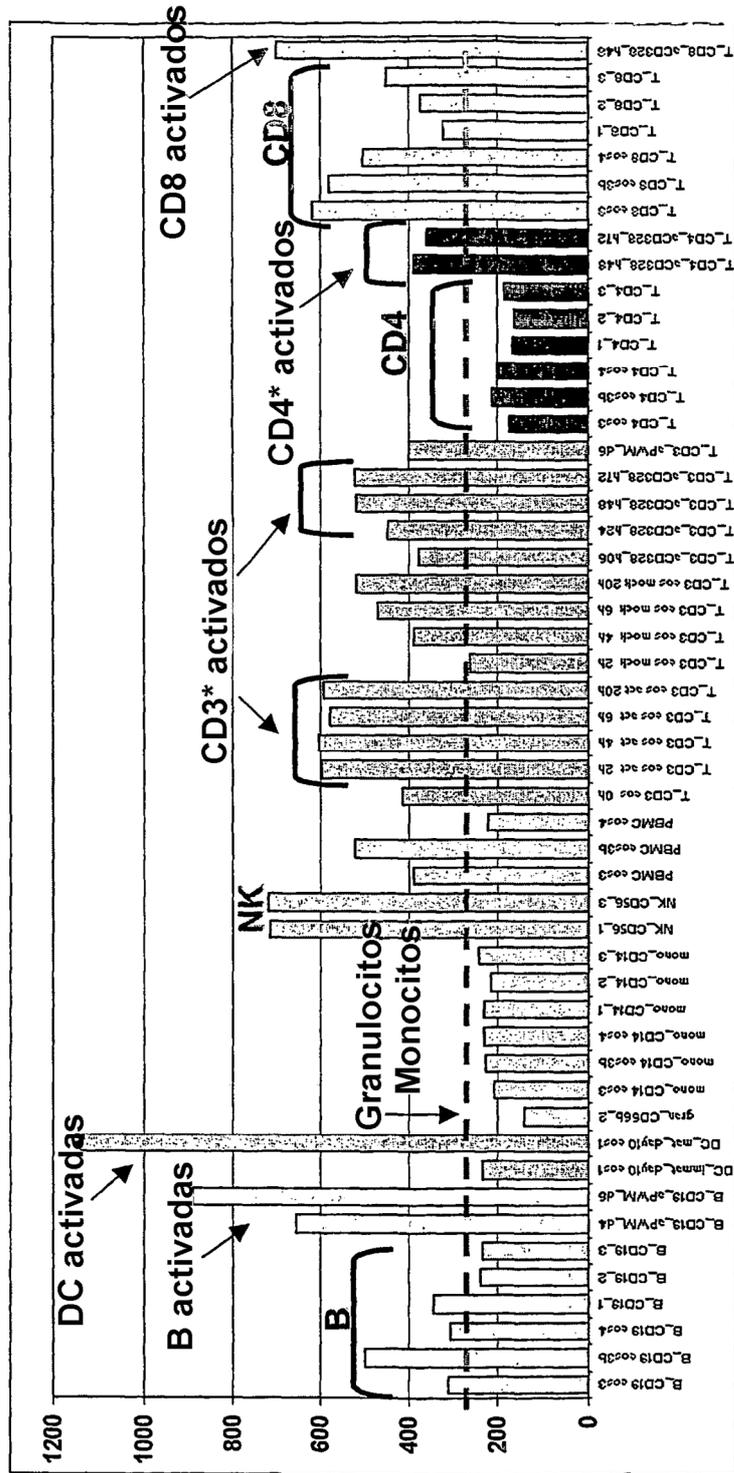


FIG. 2B

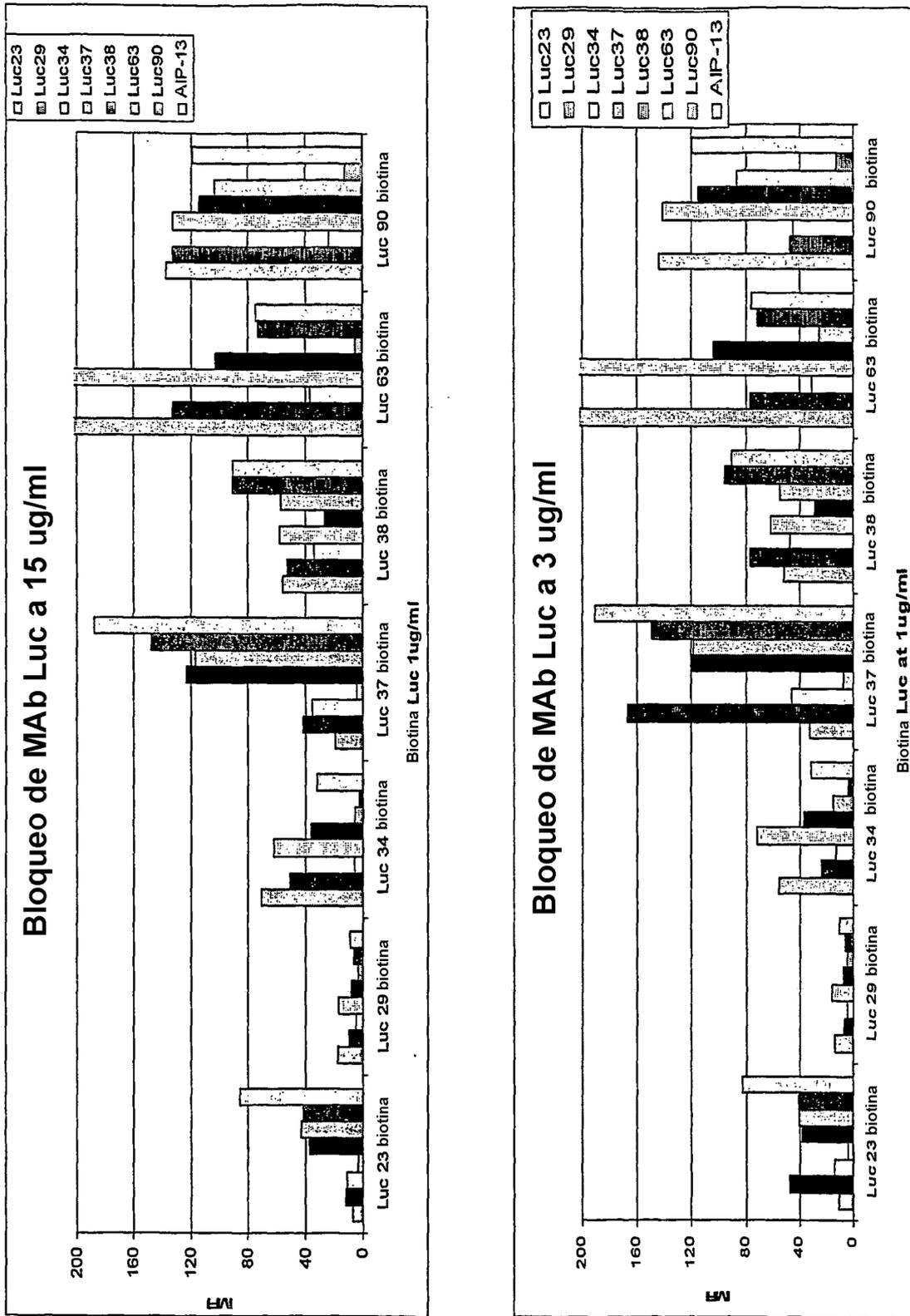


FIG. 3

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)
Luc 90,H1	4,56e4	2,81e-4	6,29e-9 ± 2,06e-9
Luc 63,2	8,71e3	3,01e-4	3,46e-8 ± 8,86e-9
Luc 34,1	7,48e3	1,27e-3	1,73e-7 ± 3,46e-8

FIG. 4

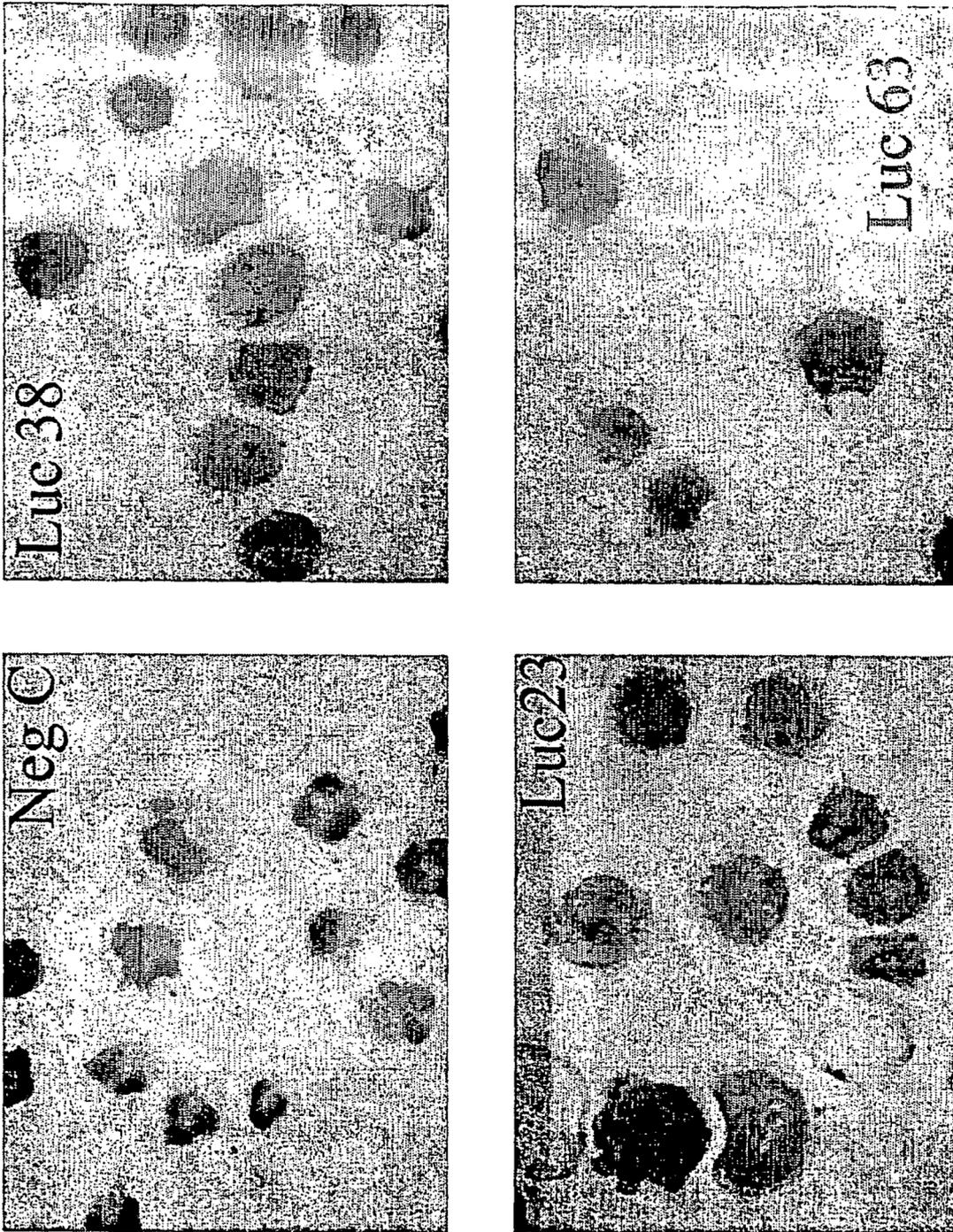


FIG. 5A

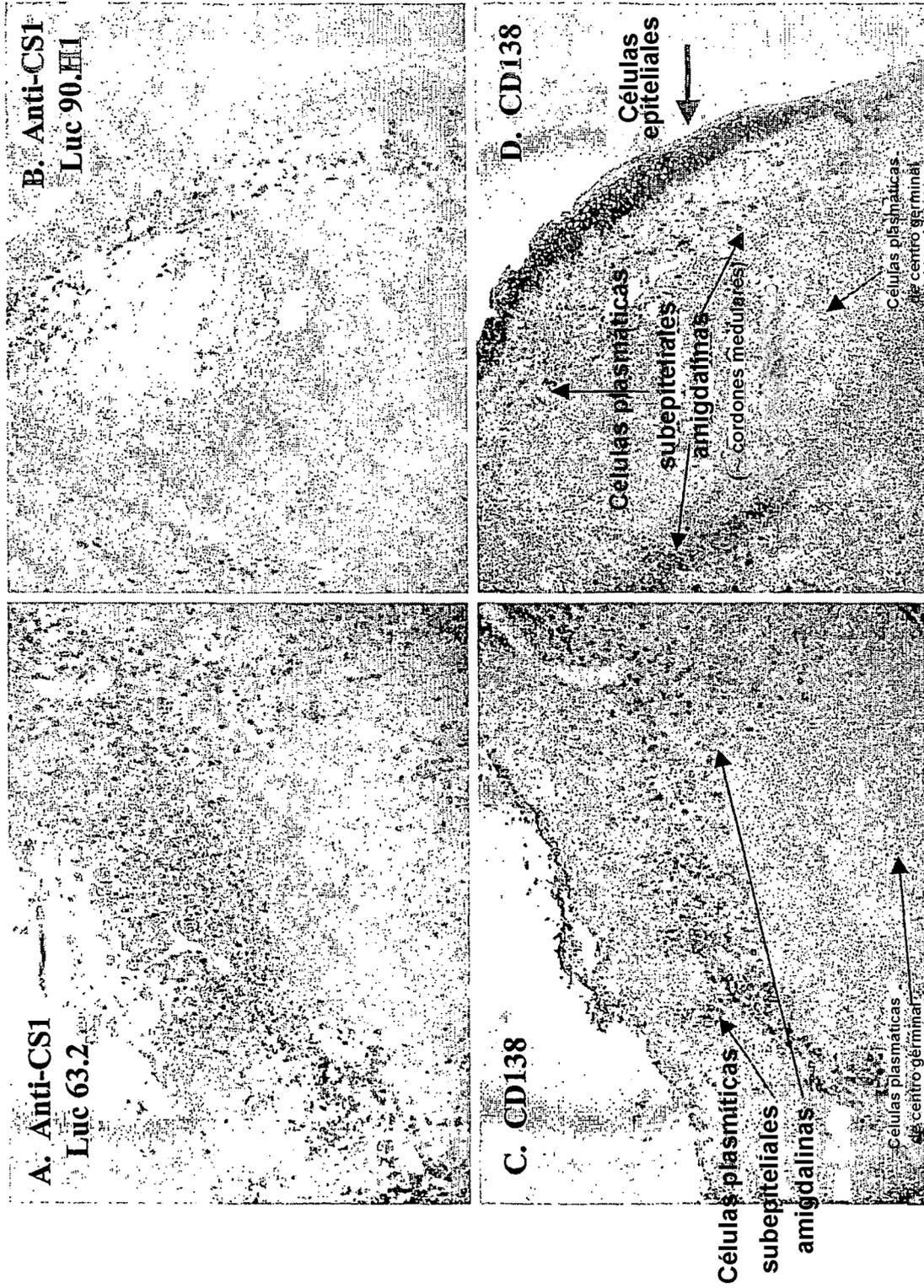


FIG. 5B

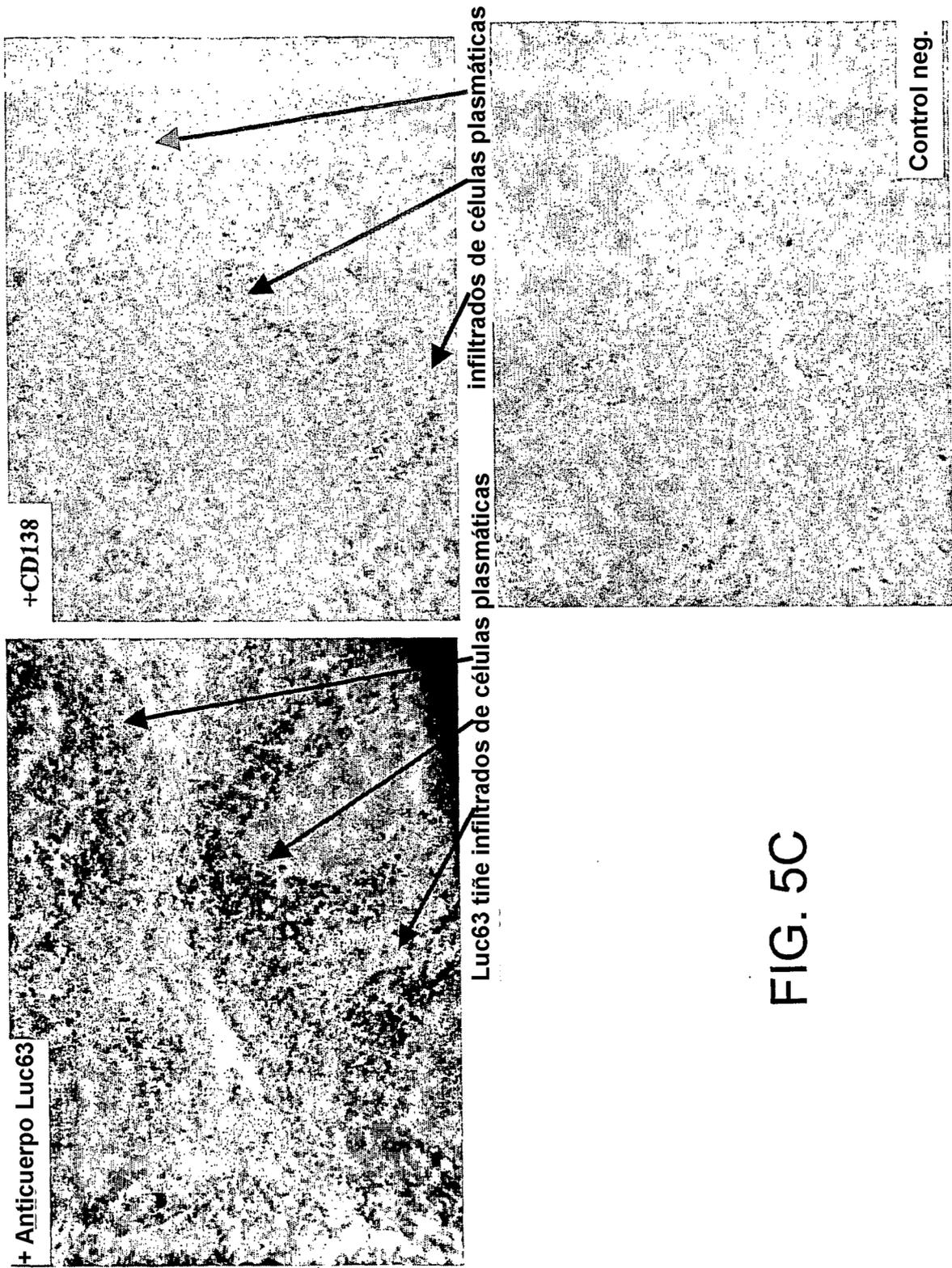


FIG. 5C

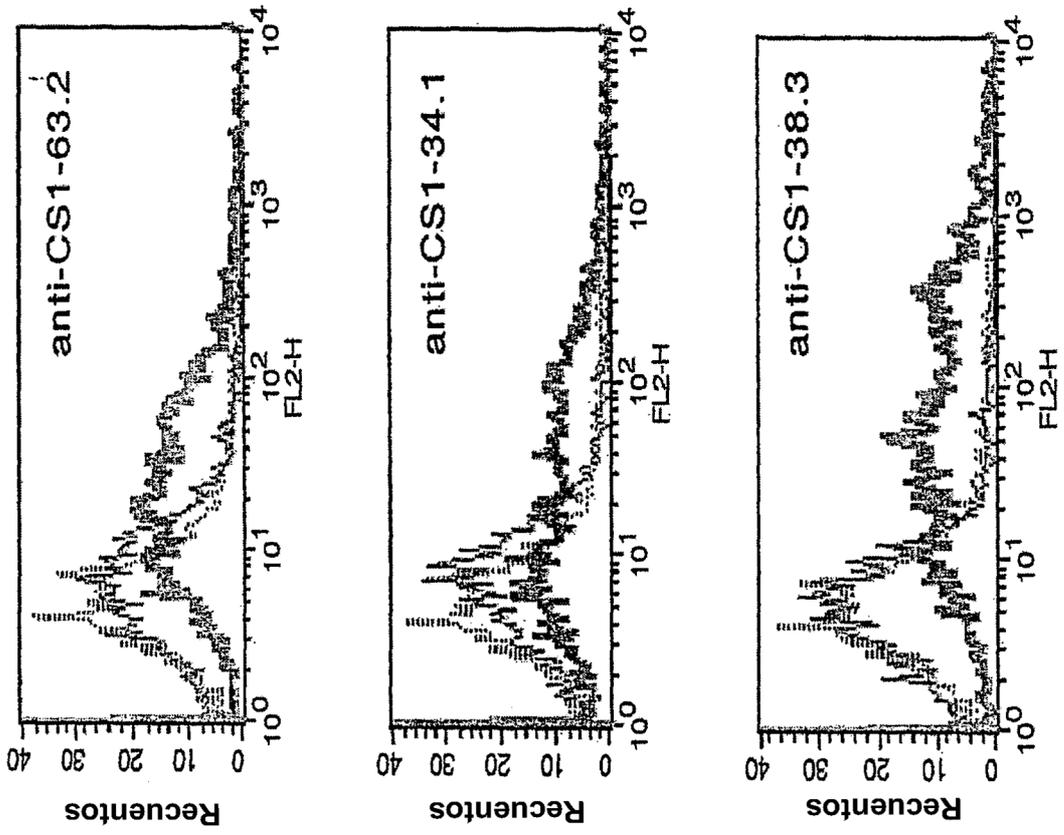


FIG. 6

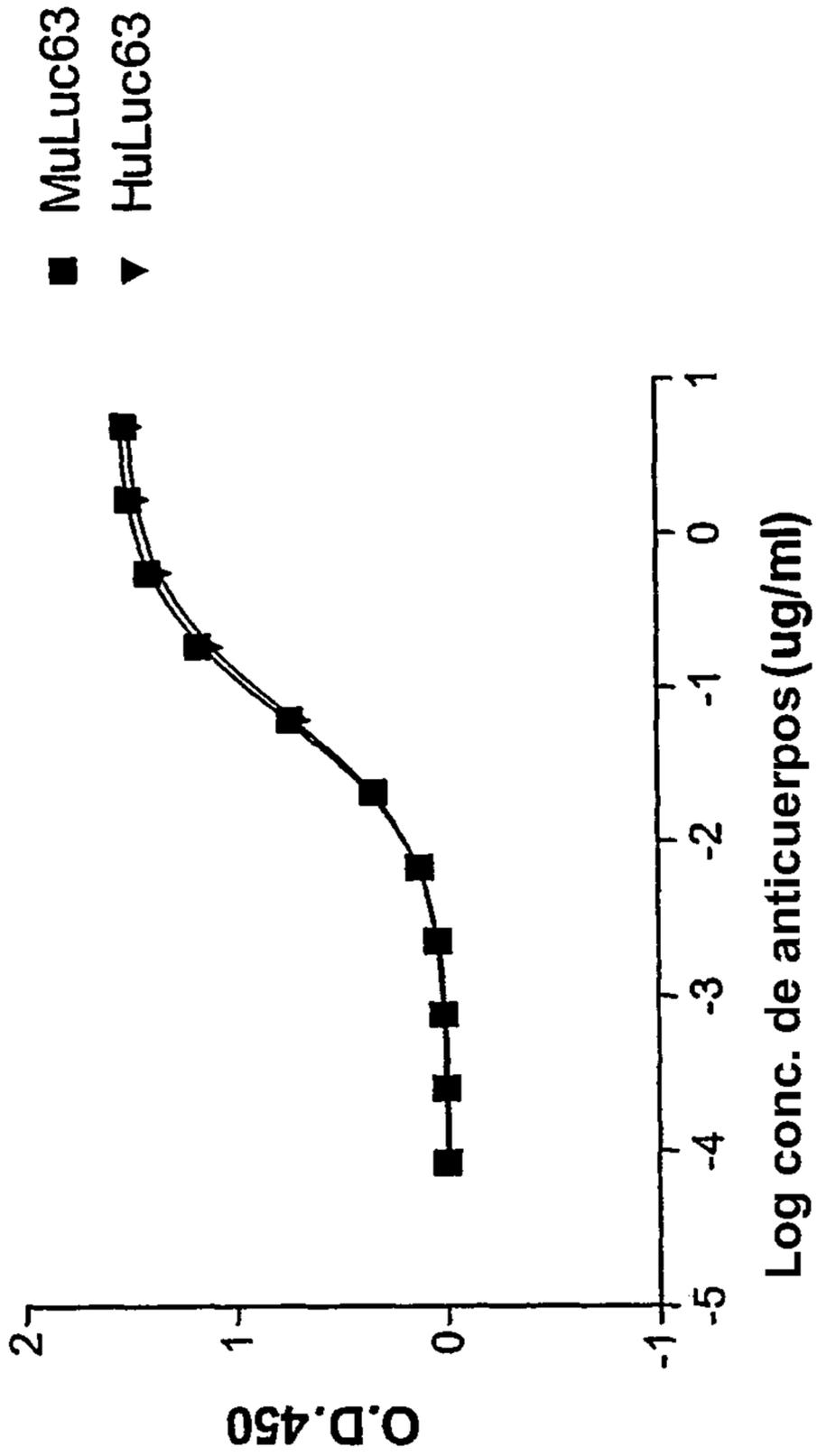


FIG. 7

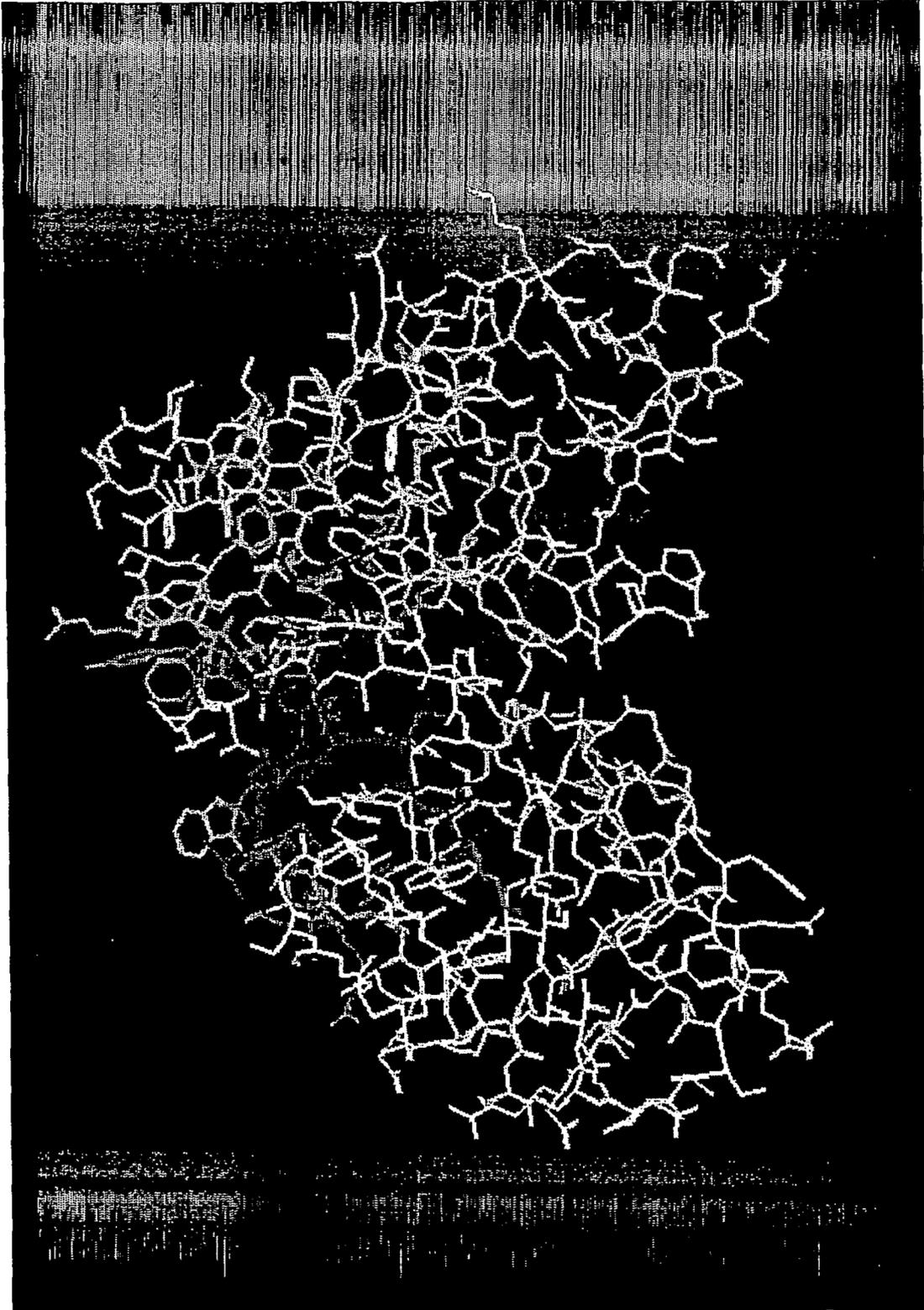
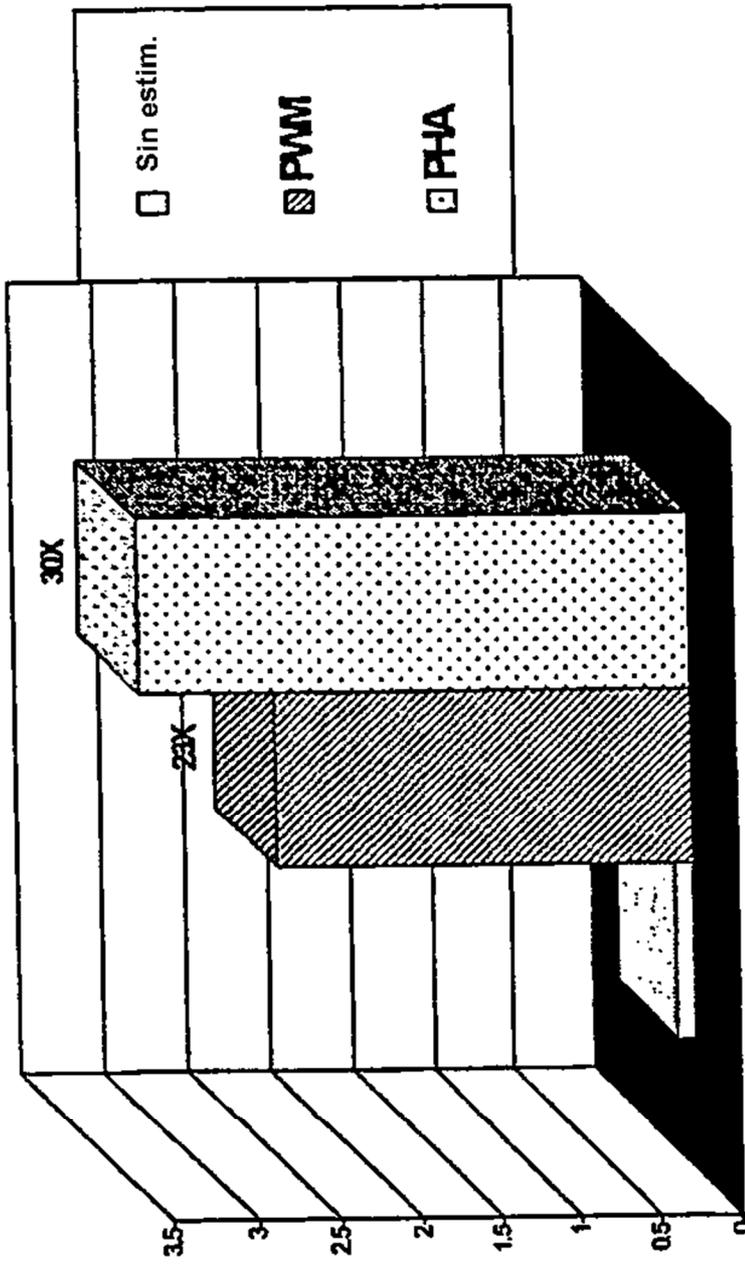


FIG. 8



Análisis mediante PCR en tiempo real: Normalizado para ARNr 18S

FIG. 9

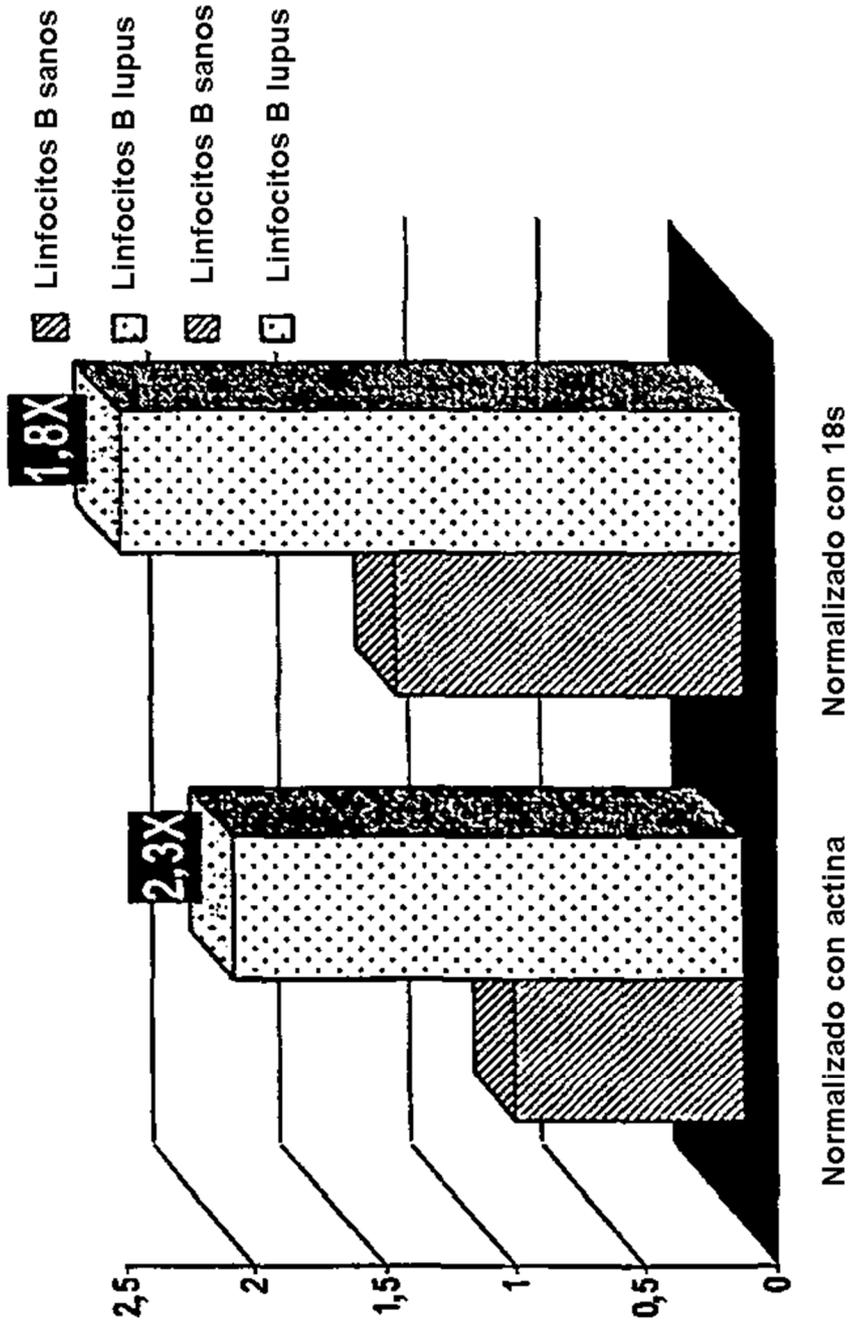


FIG. 10

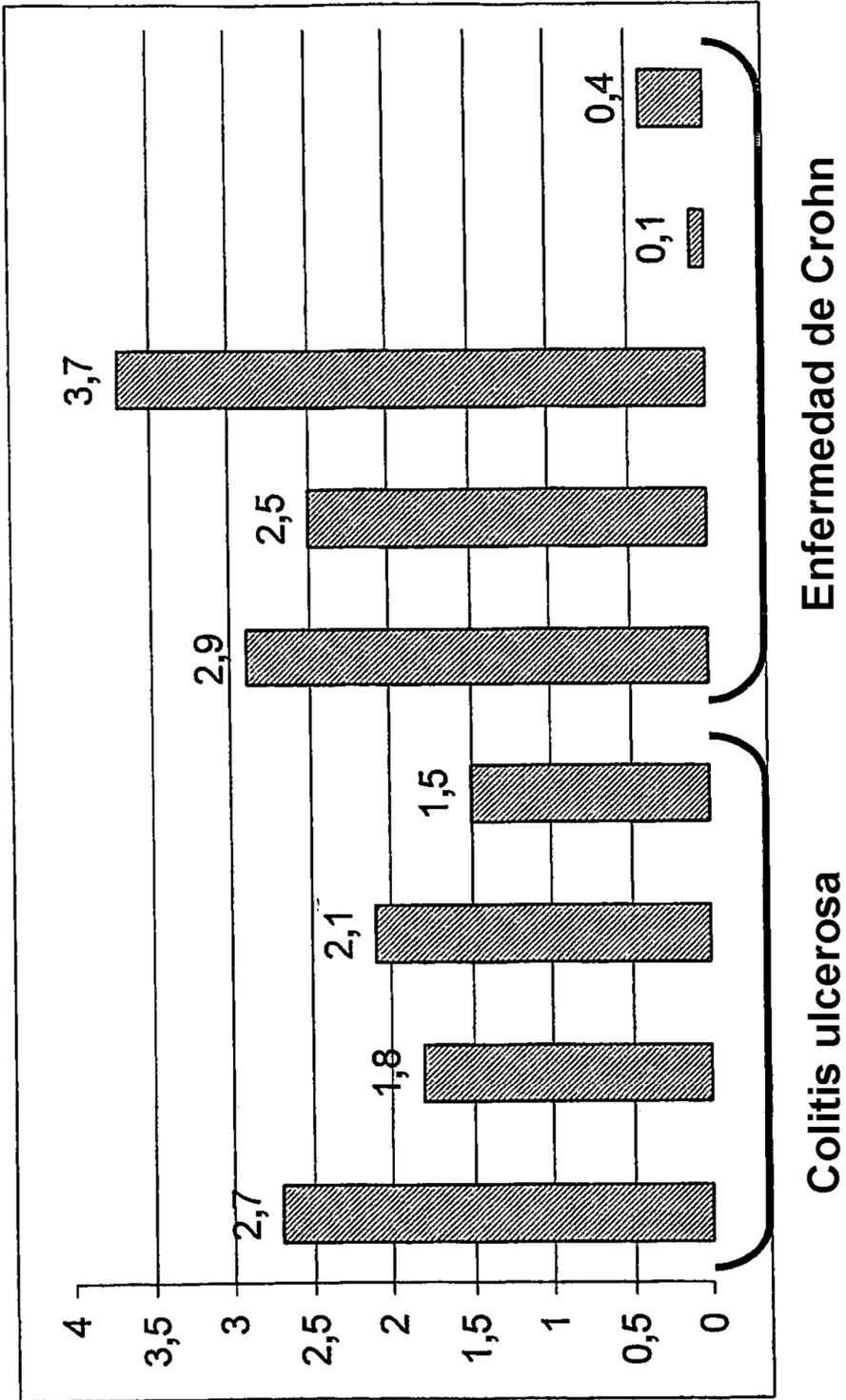


FIG. 11

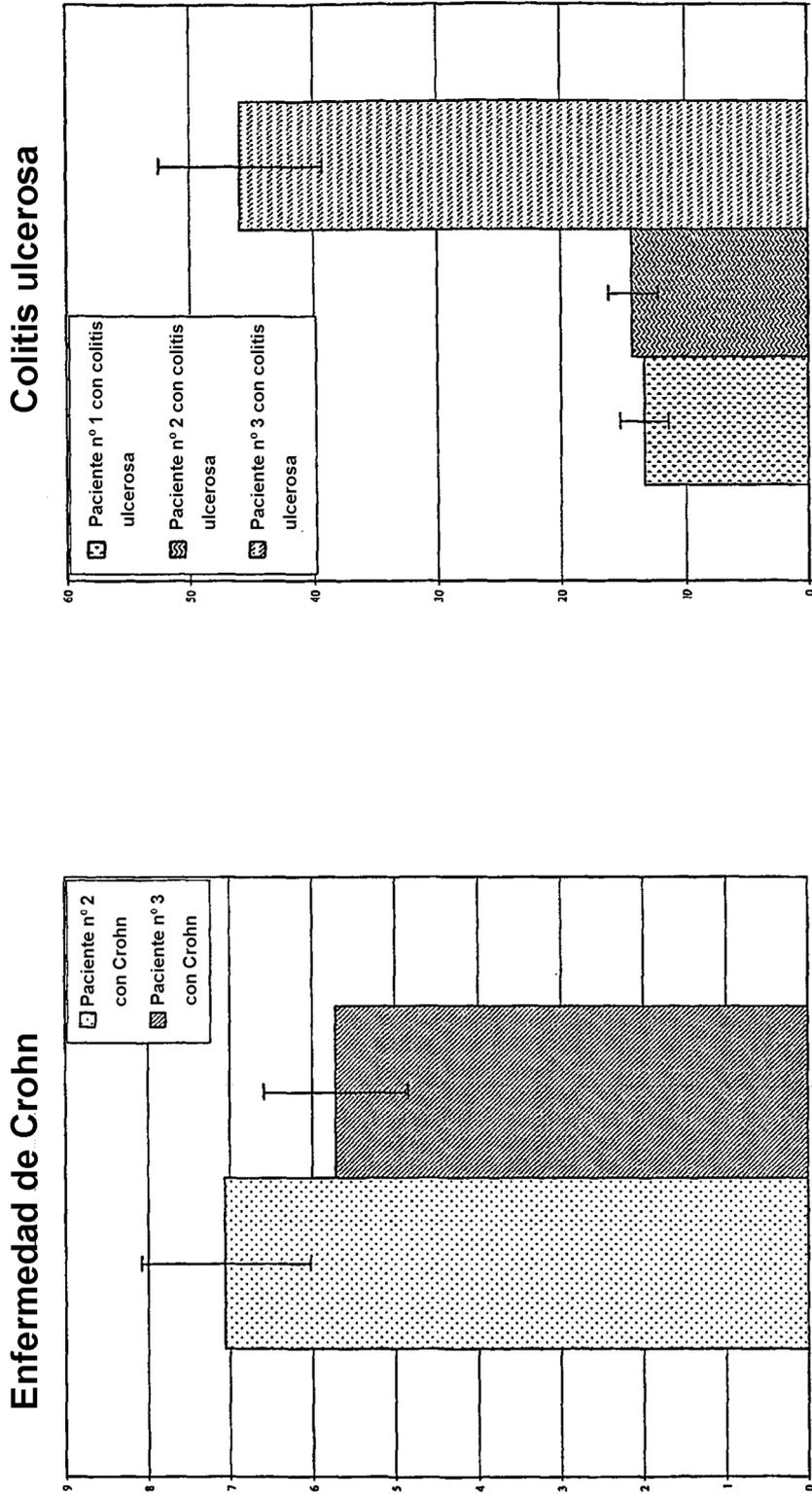


FIG. 12

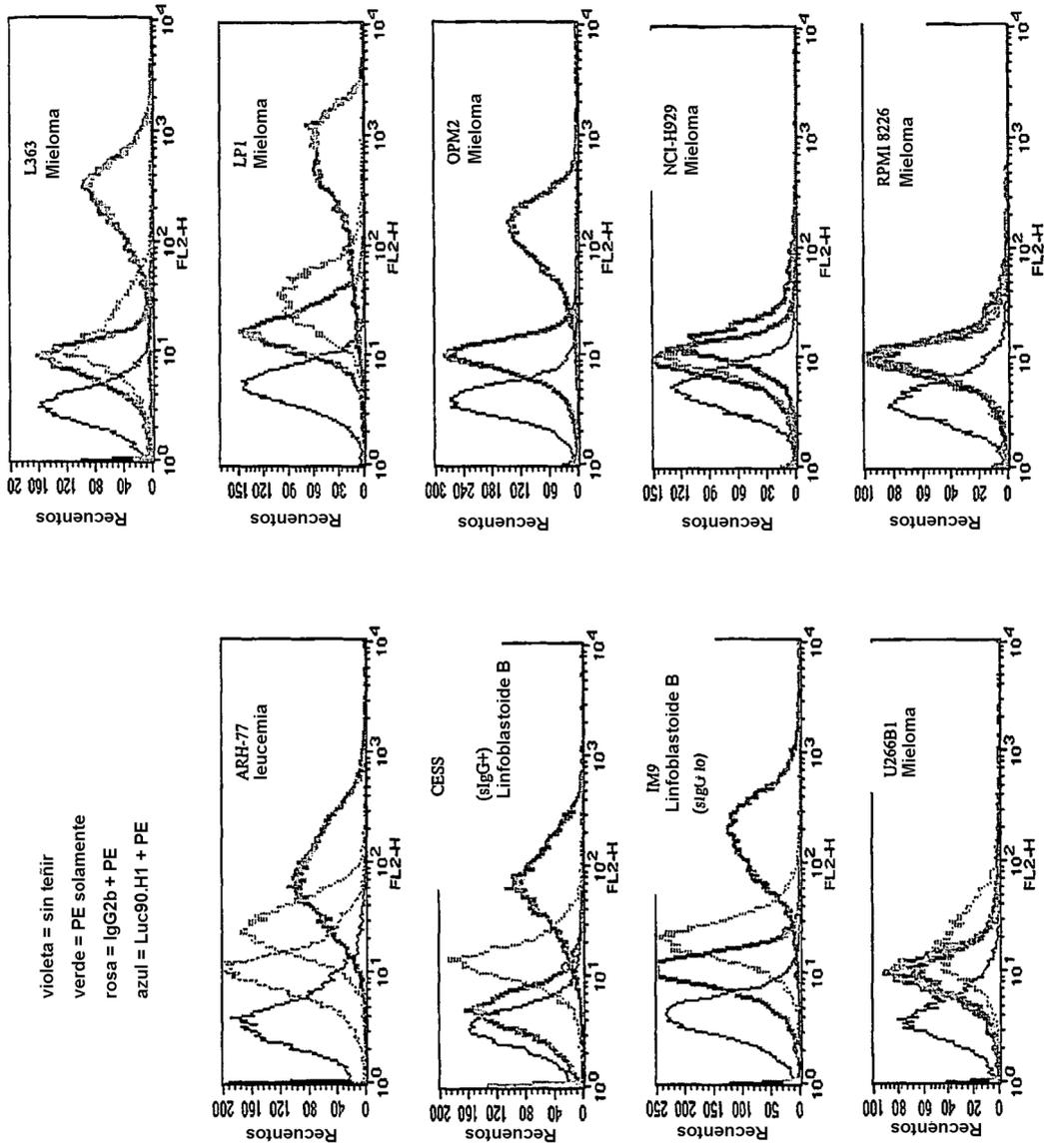


FIG. 13

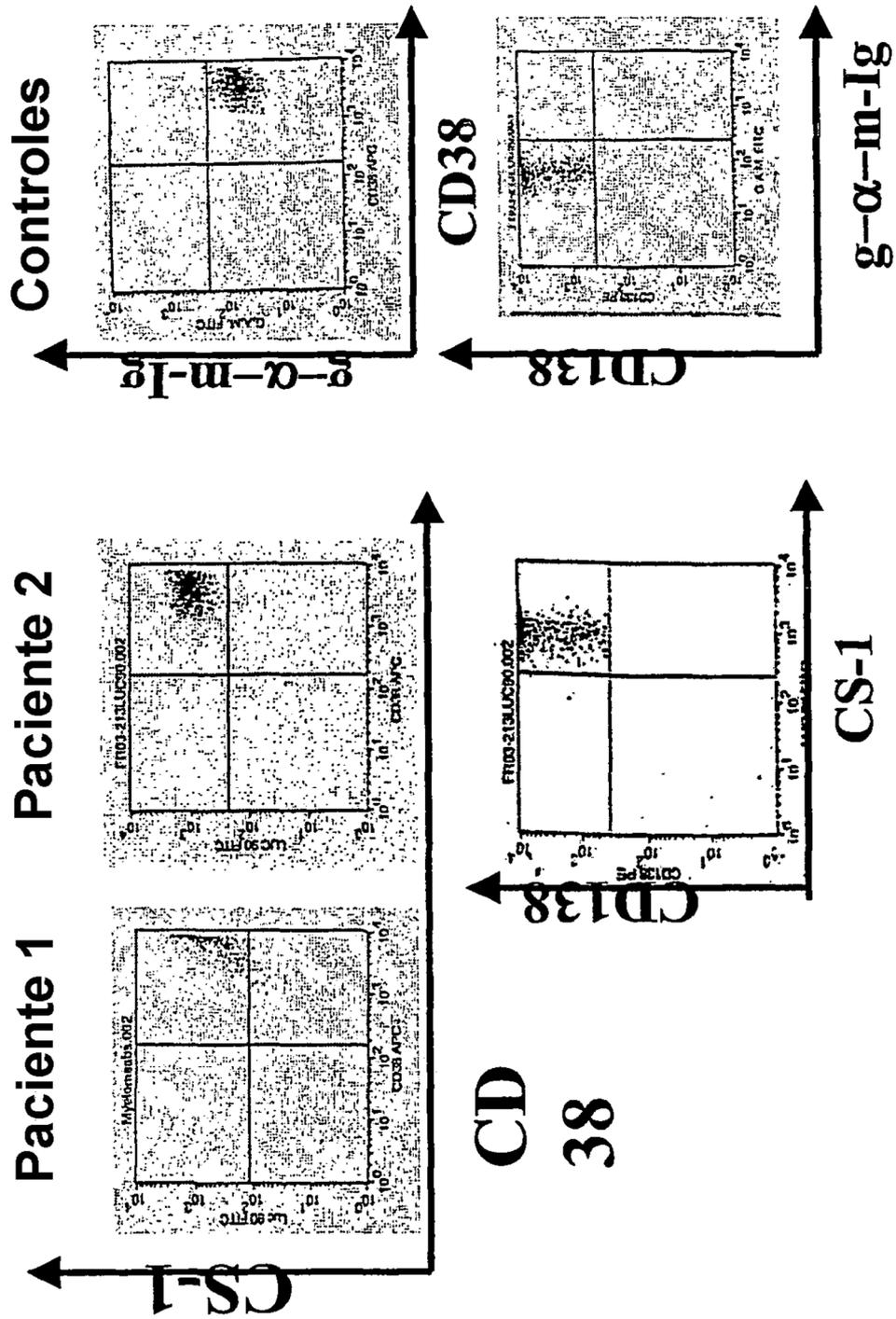


FIG. 14A

Encerrado en Células Plasmáticas de Médula Ósea

CD45^{dim} CD38^{hi}

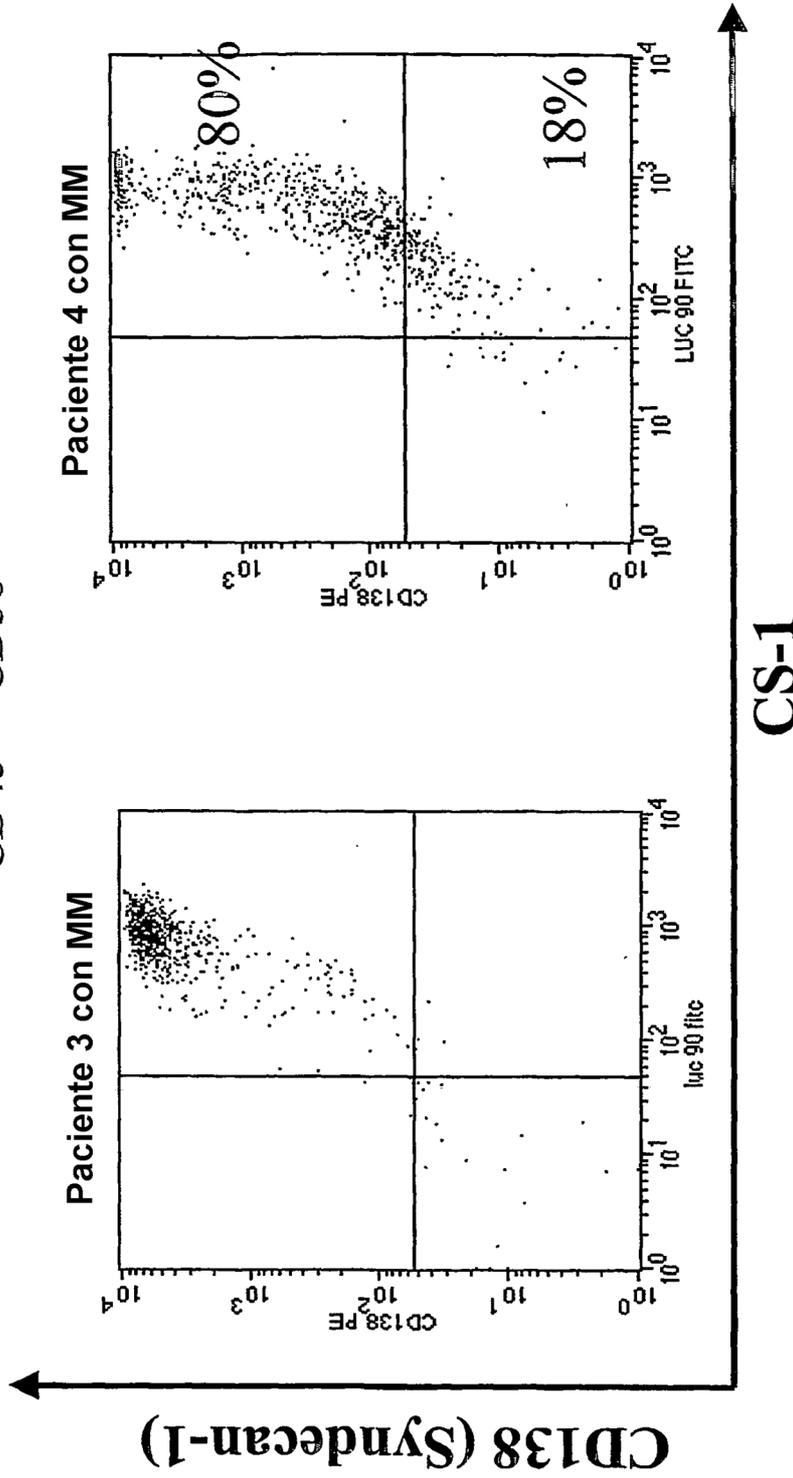


FIG. 14B

MM 5

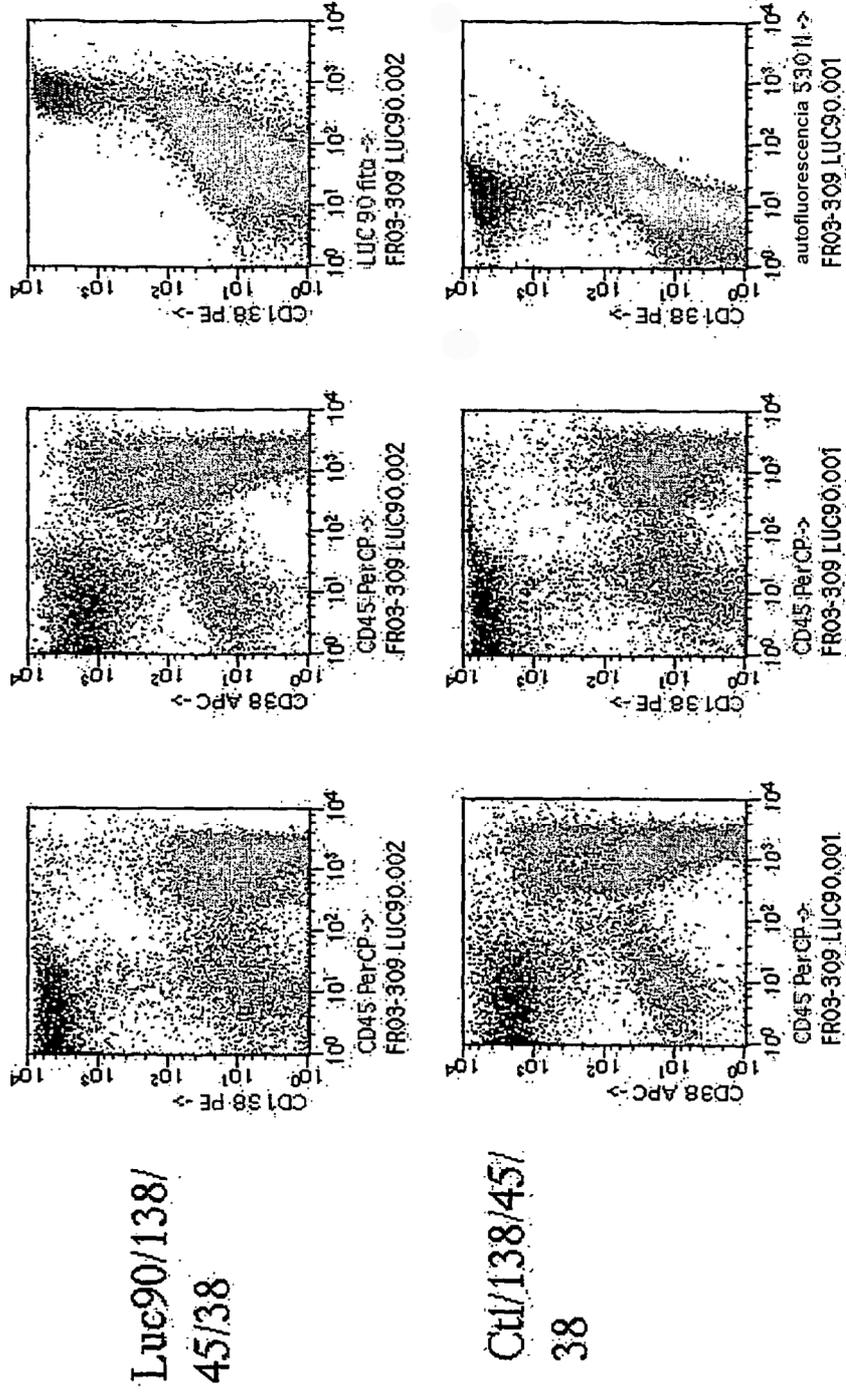


FIG. 14C

MM6

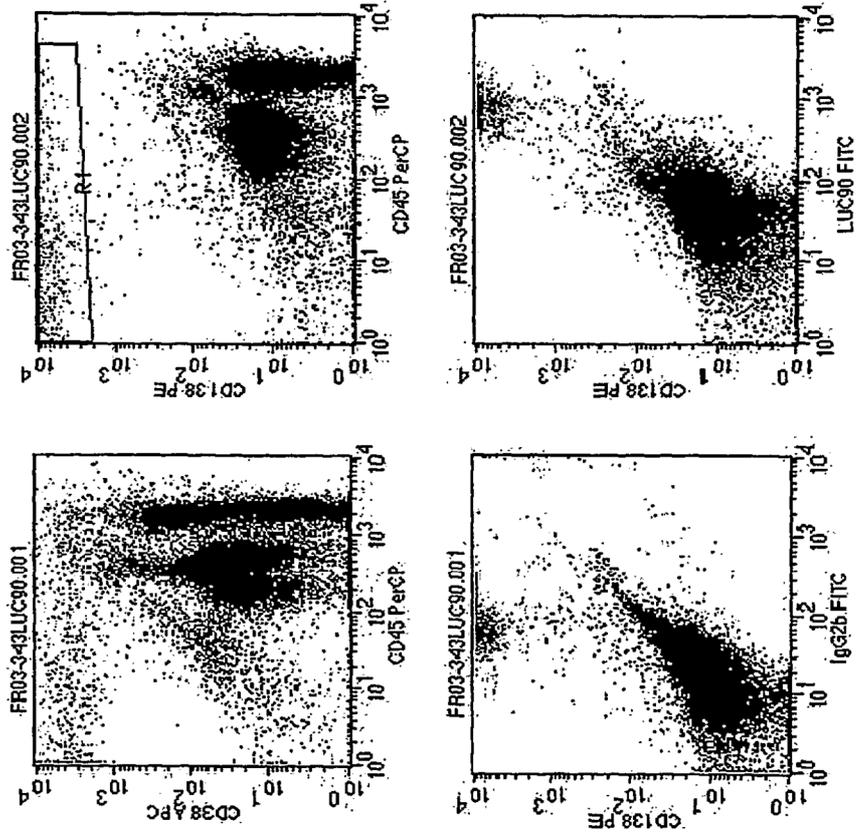


FIG. 14D

MM7

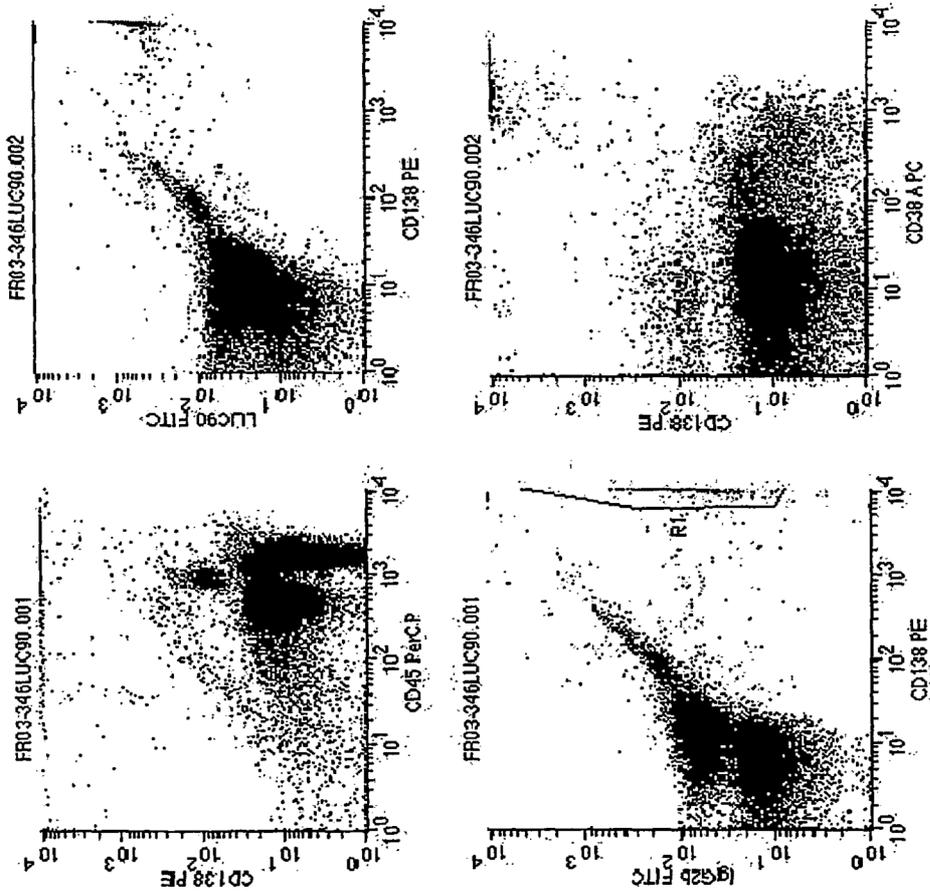


FIG. 14E

MM 8

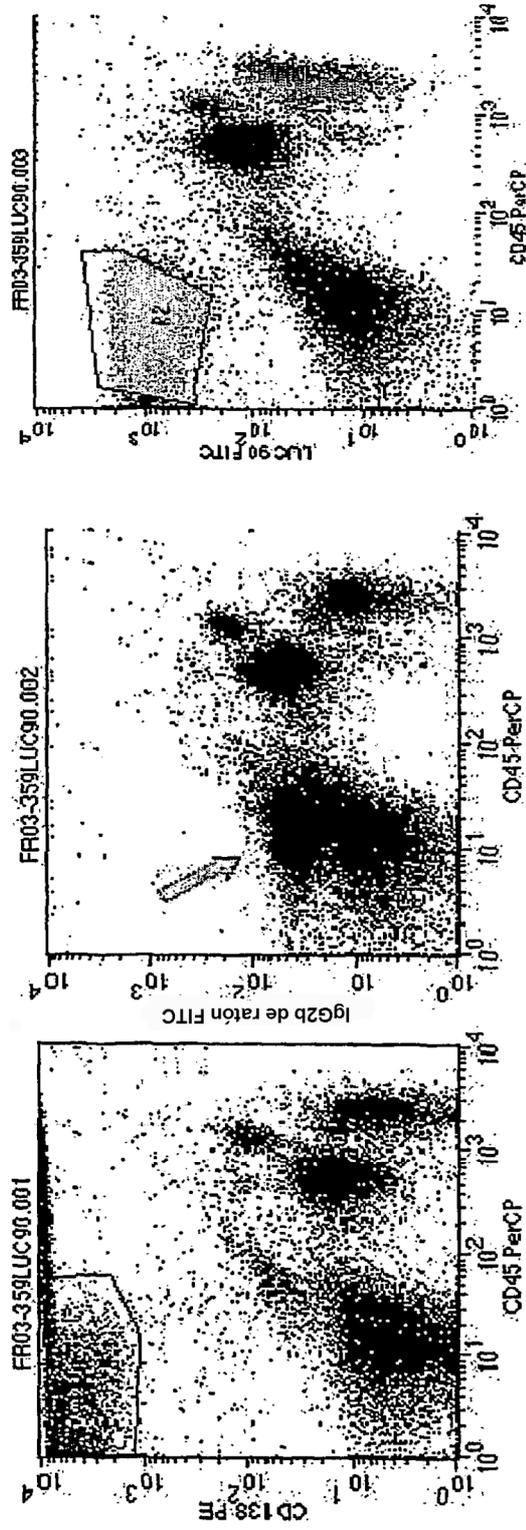


FIG. 14F

MM 9

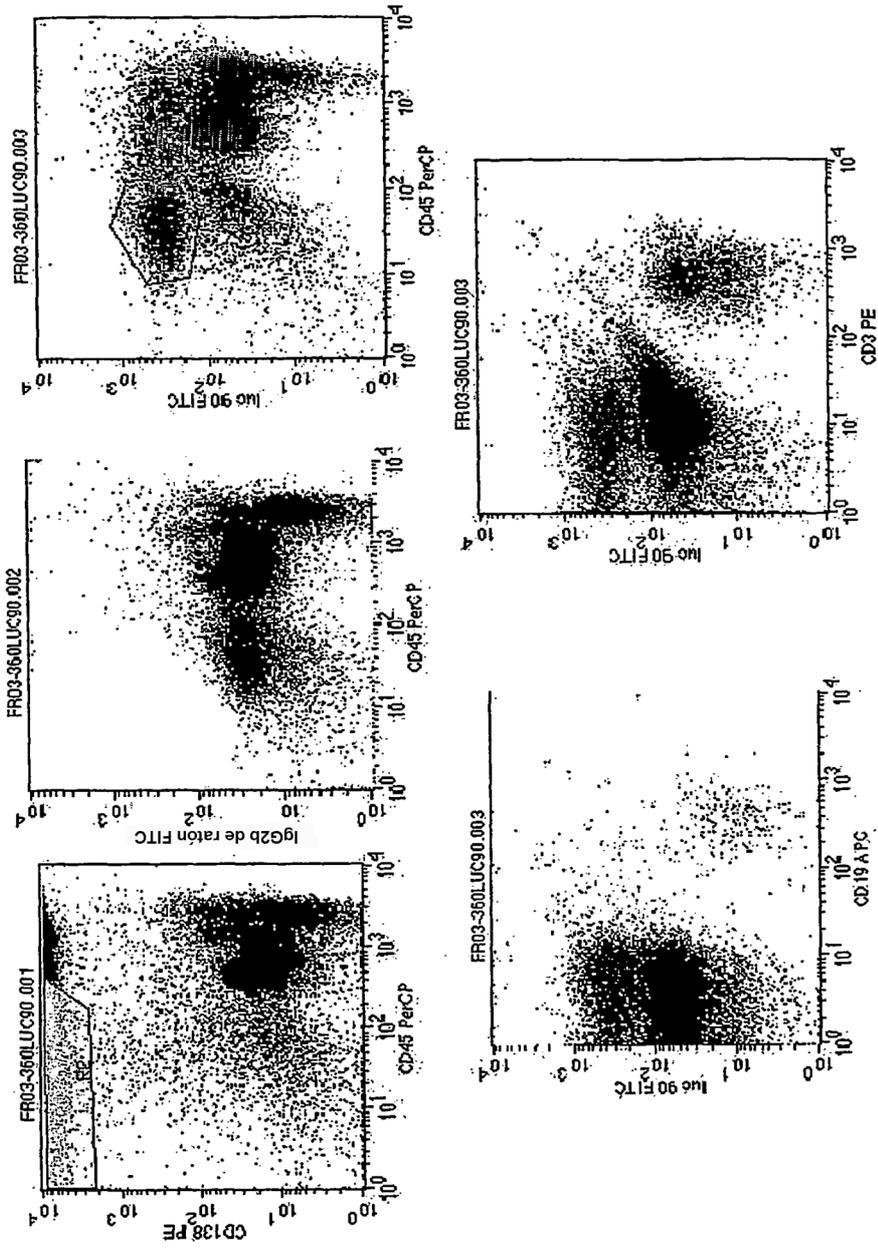


FIG. 14G

MM 10

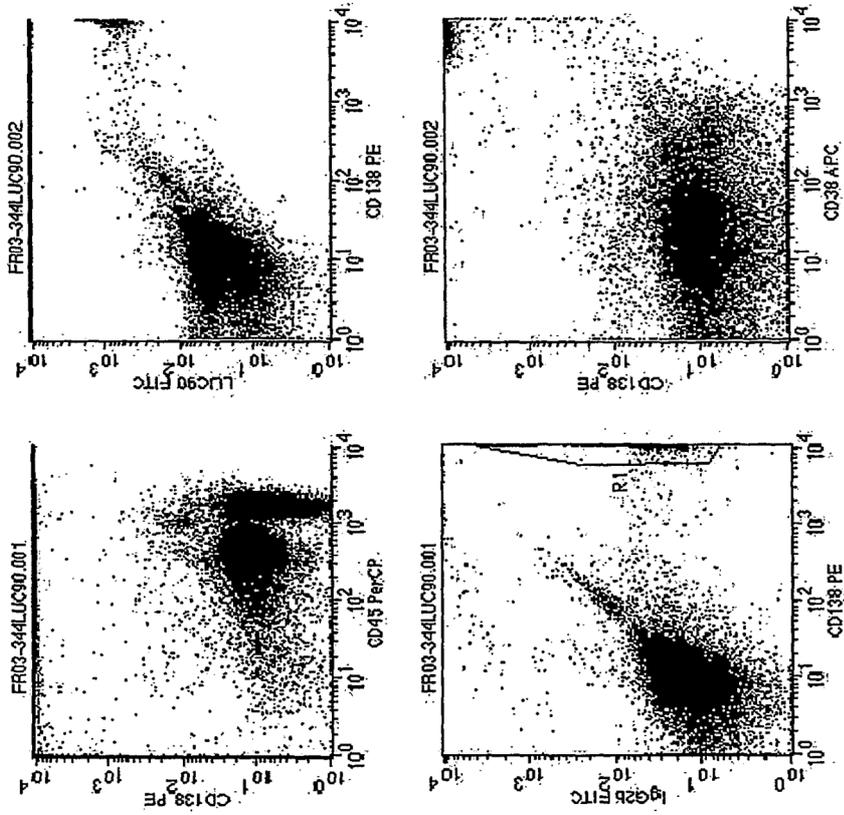


FIG. 14H

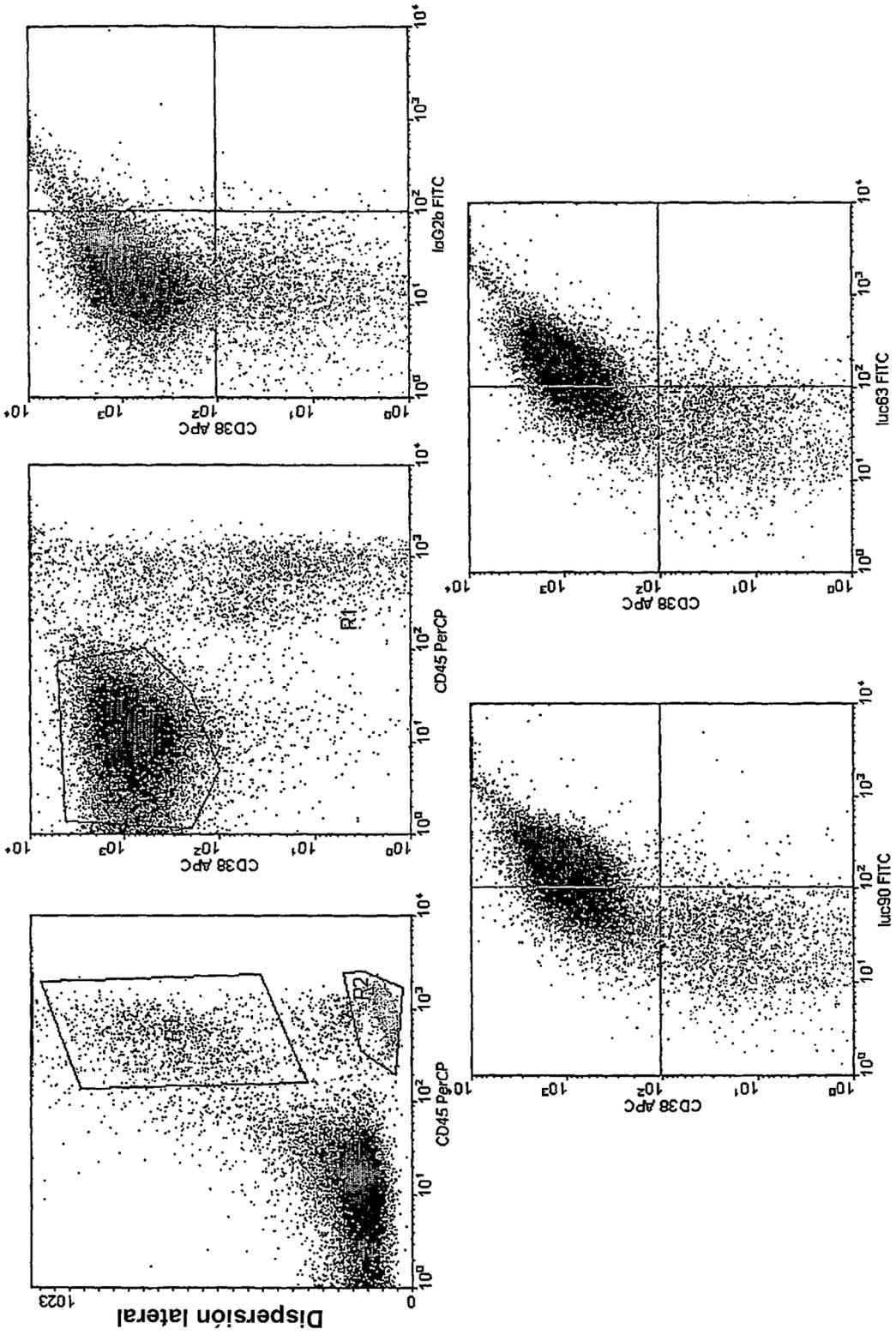


FIG. 141

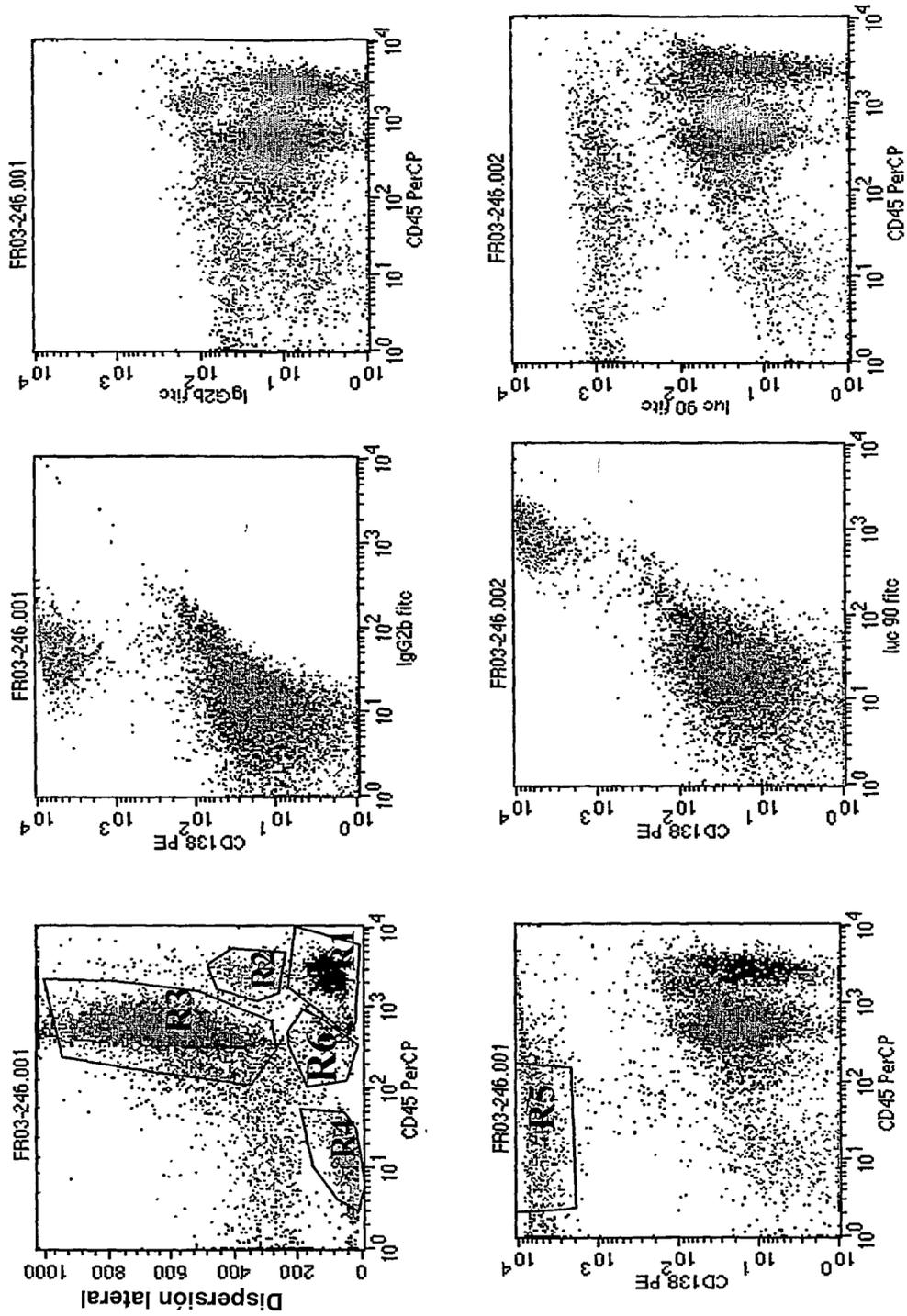


FIG. 15

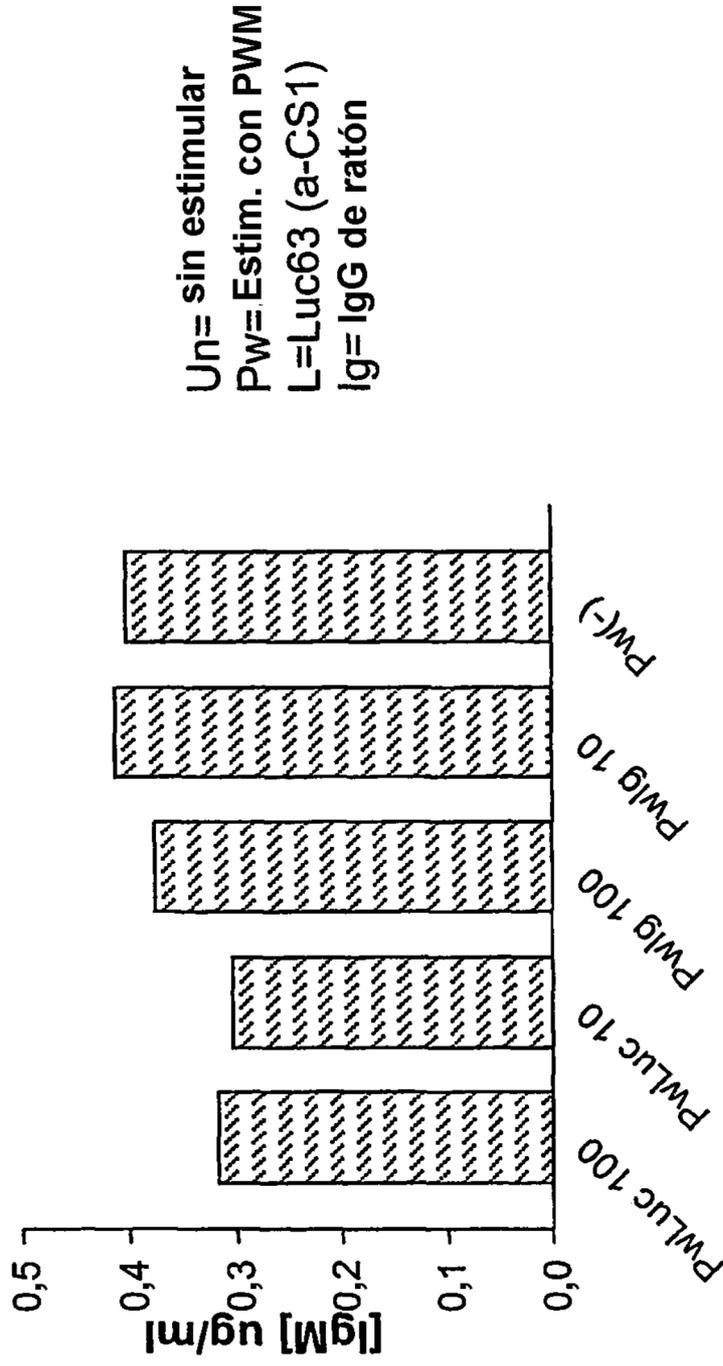


FIG. 16

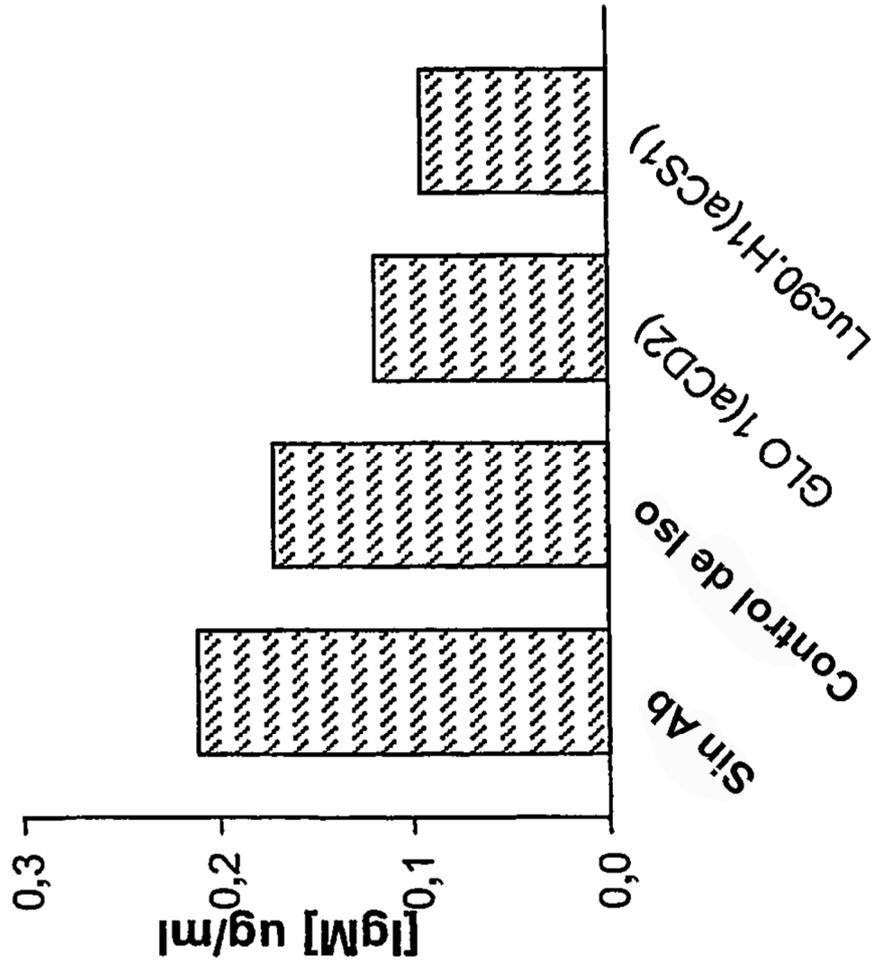


FIG. 17

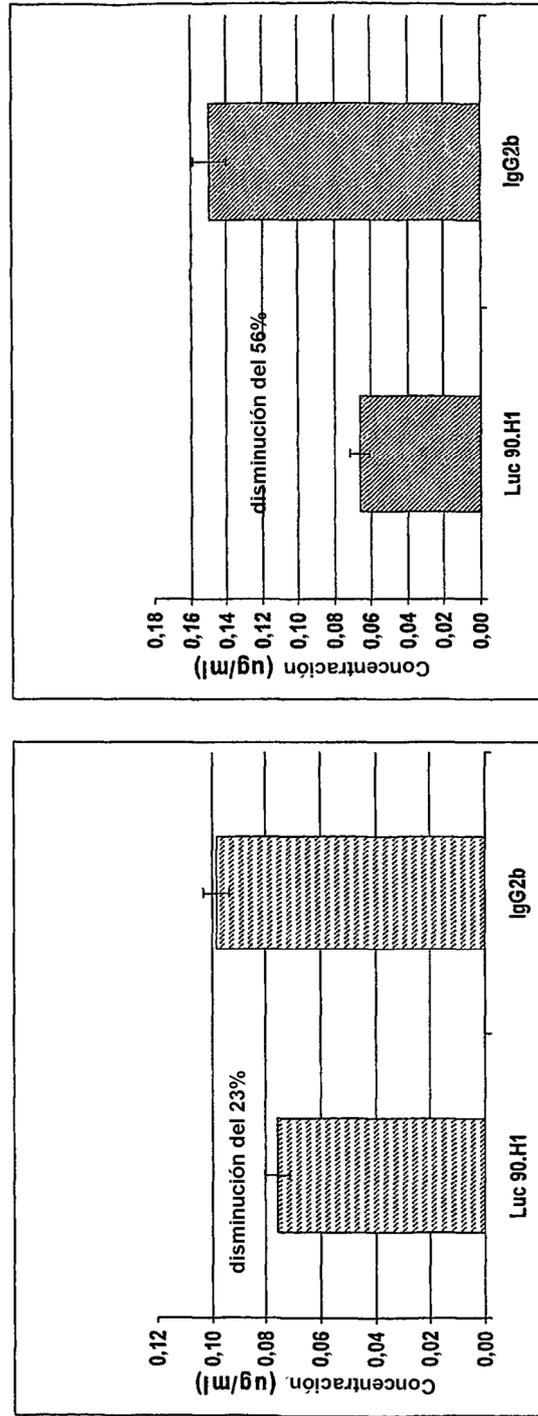


FIG. 18

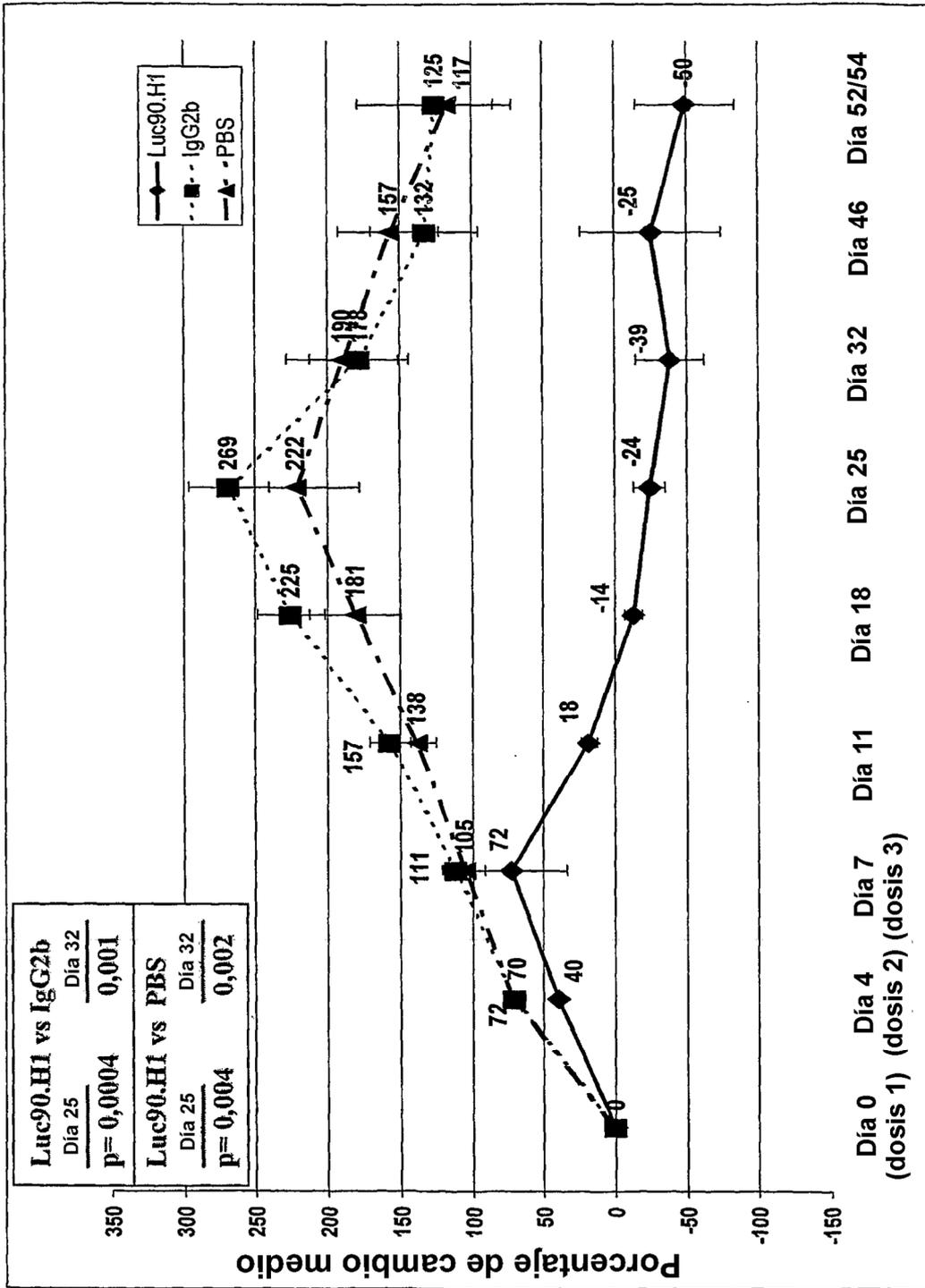


FIG. 19A

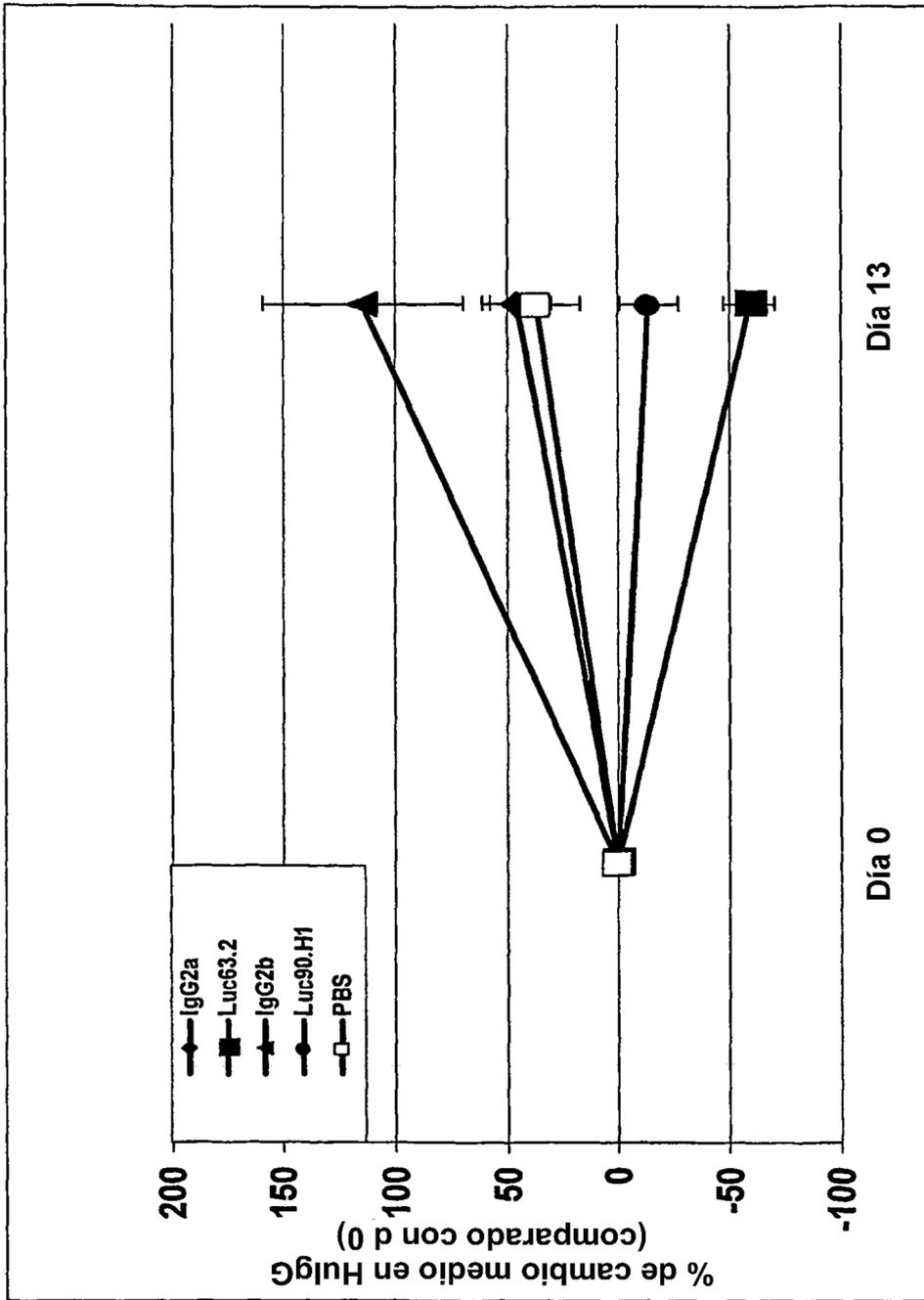


FIG. 19B

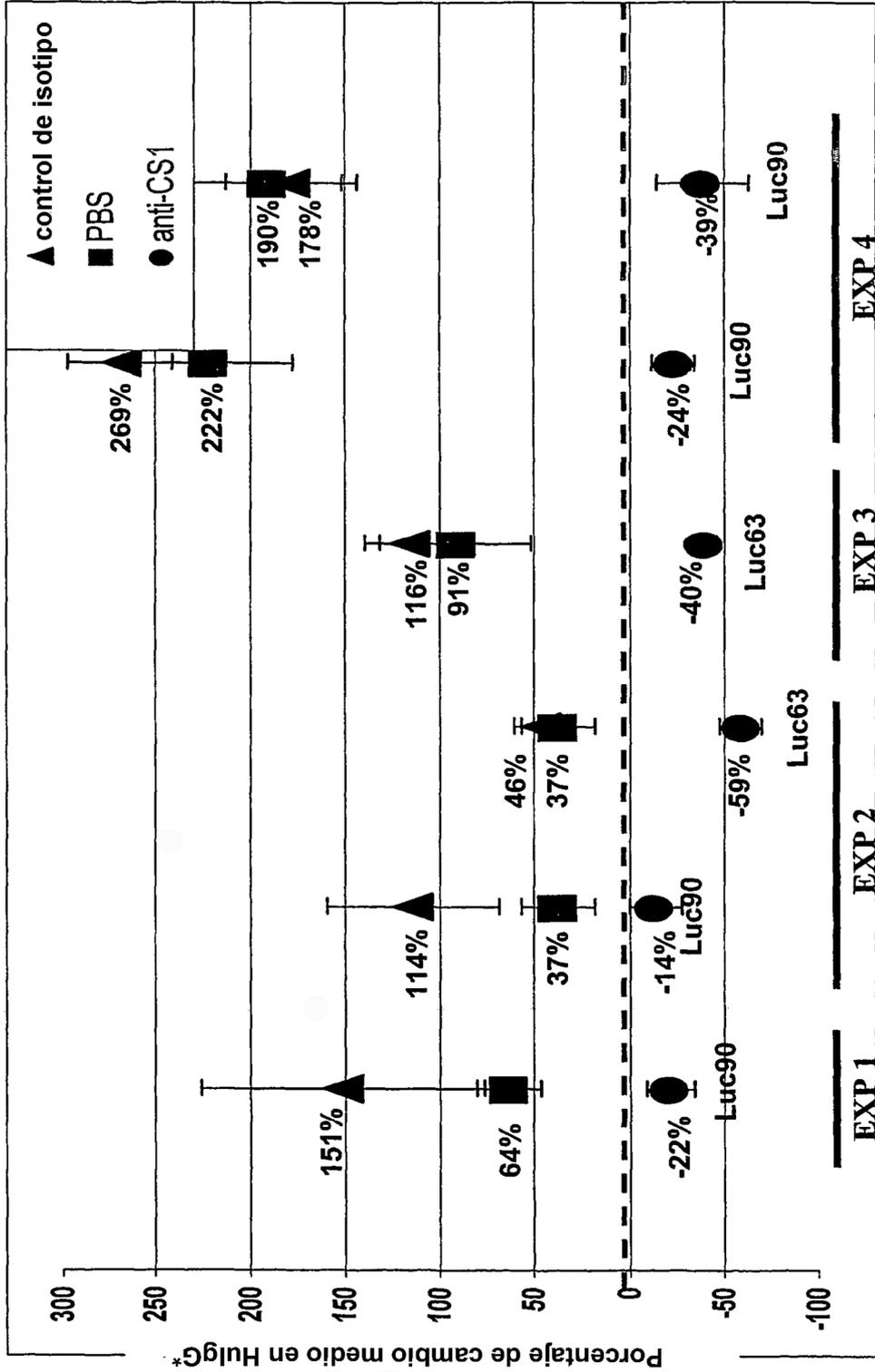


FIG. 19C

α -CS1 vs PBS $p = 0,03-0,004$
 α -CS1 vs isotipo $p = 0,02-0,0008$

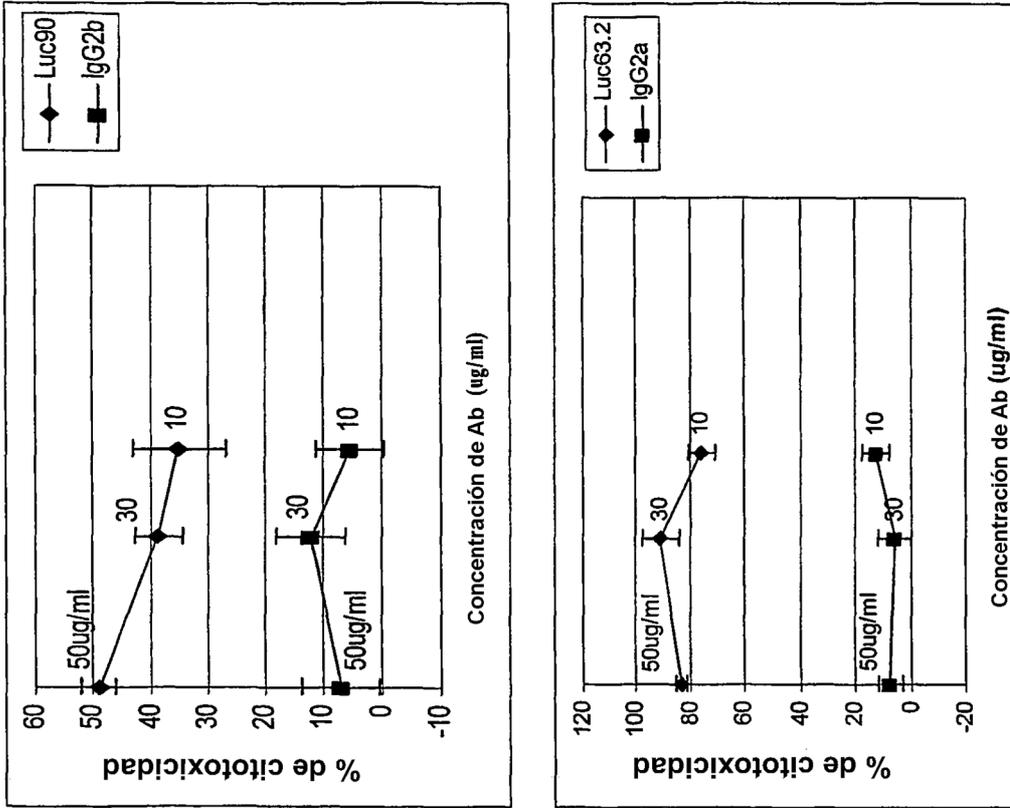


FIG. 20

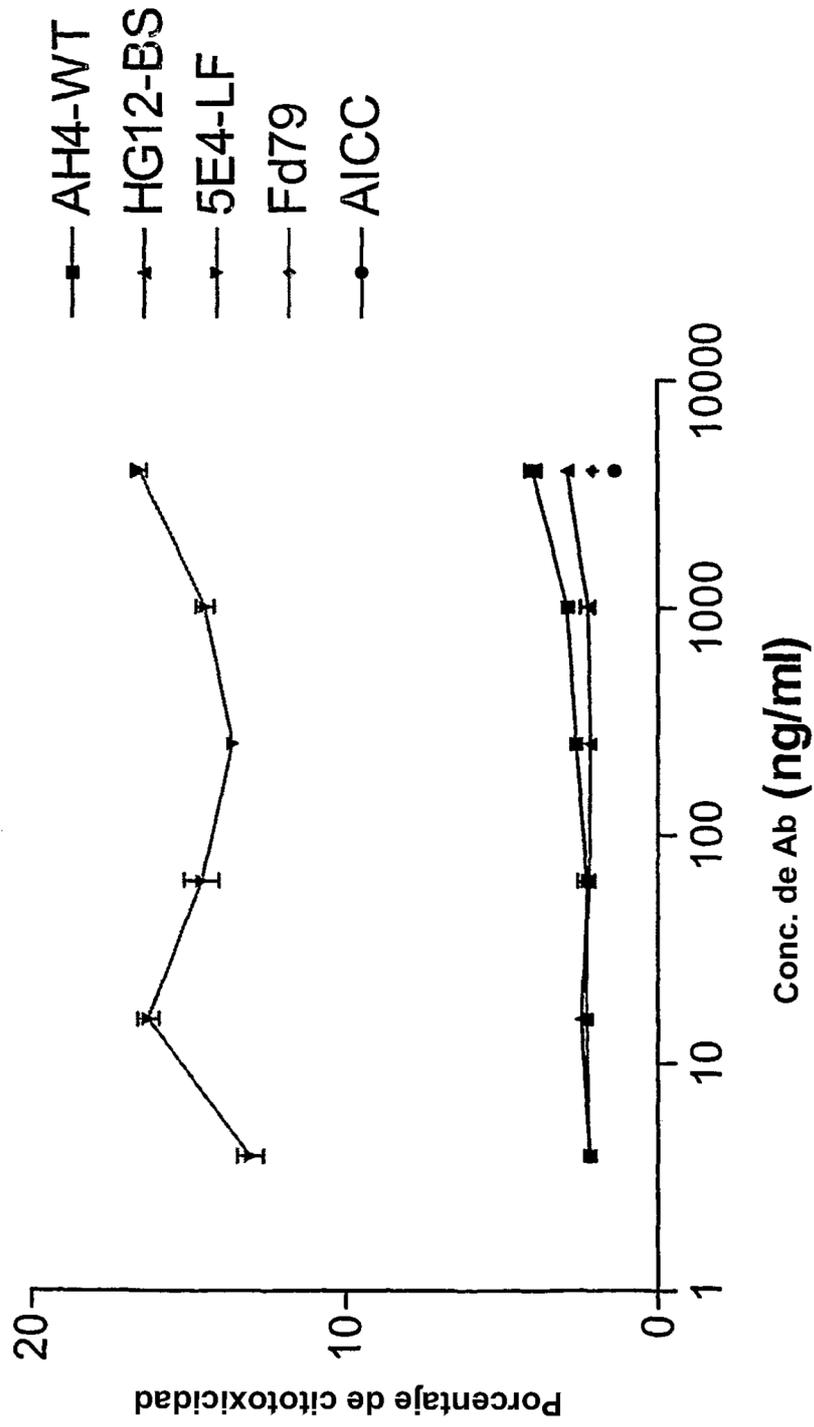


FIG. 21A

ADCC de células OPM2 por anticuerpos
Luc-90 quiméricos
(destoxificados)

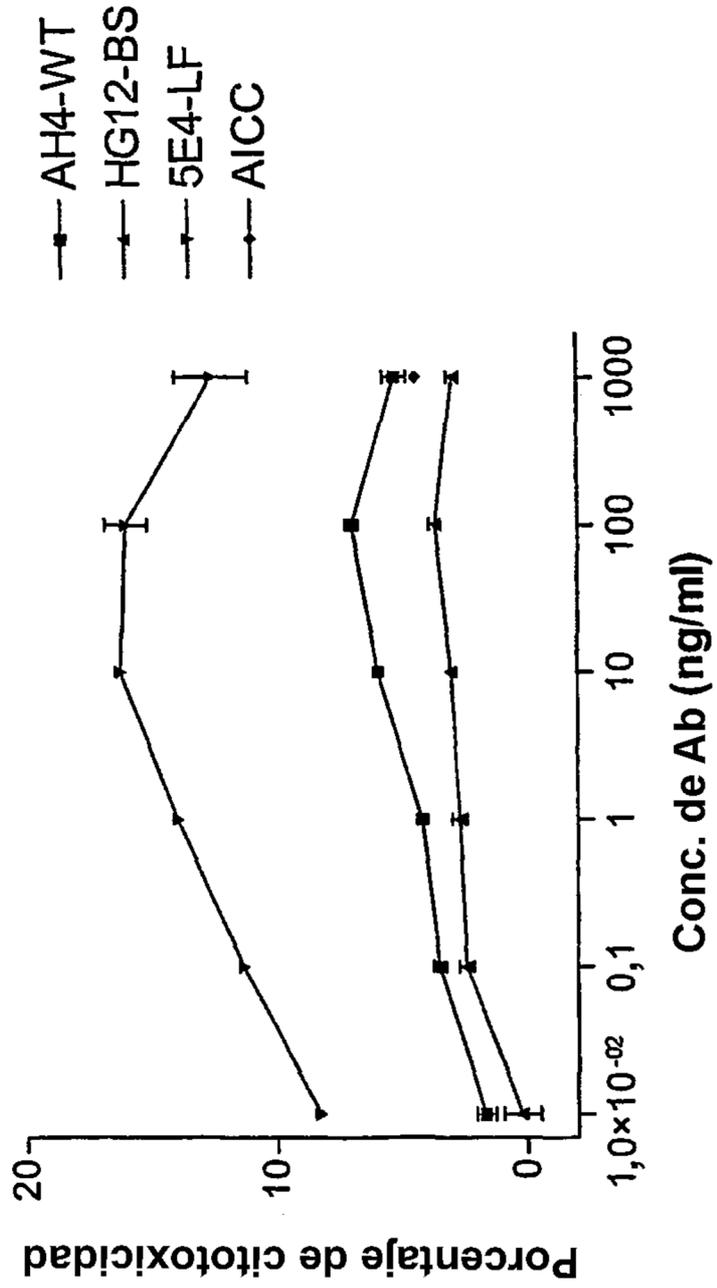


FIG. 21B

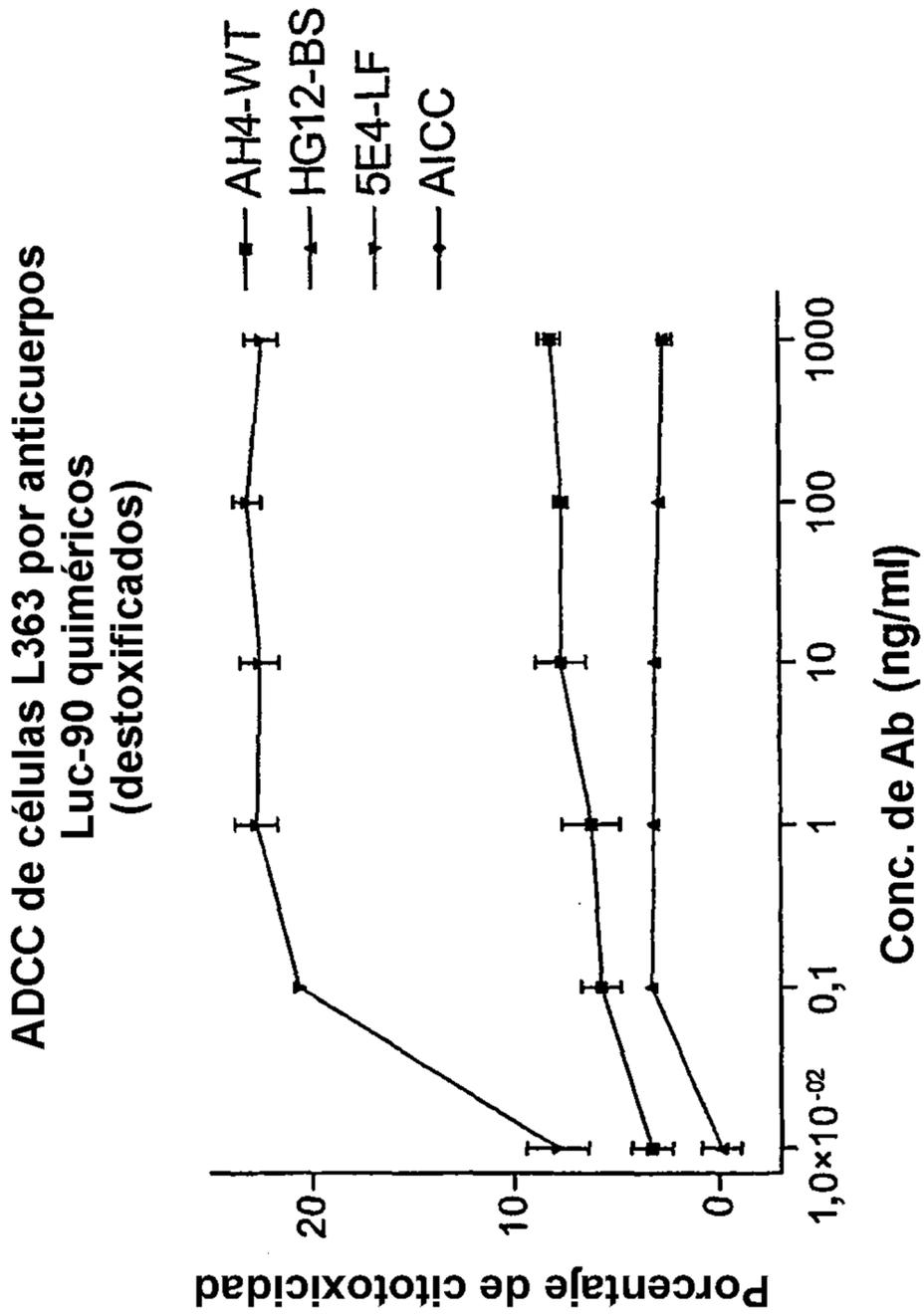


FIG. 21C

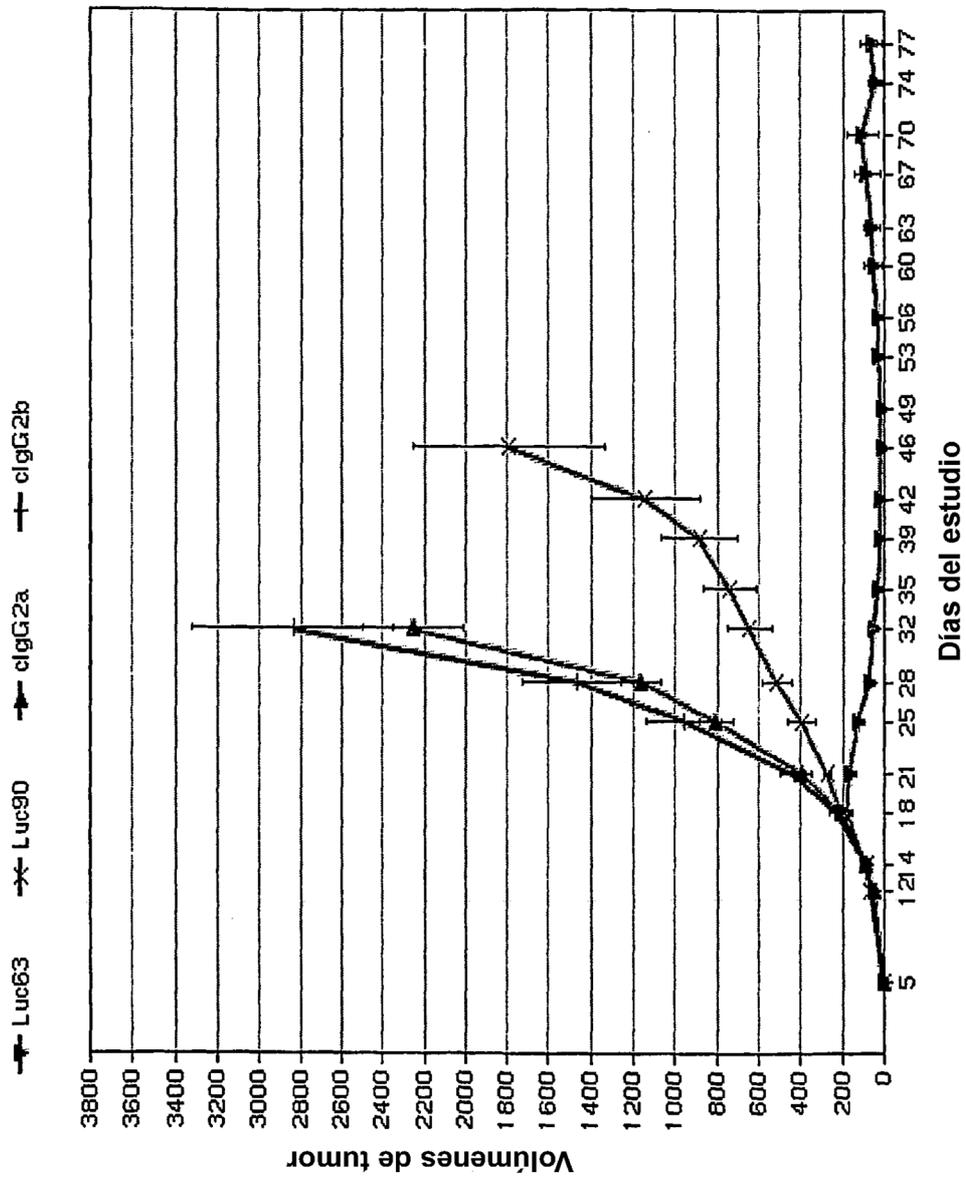


FIGURA 22