

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 675 375**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 5/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.05.2008 PCT/EP2008/004197**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2008 WO08145338**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.05.2008 E 08758782 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2152754**

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

30 Prioridad:

29.05.2007 EP 07010622
29.05.2007 US 932099 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.07.2018

73 Titular/es:

ASTELLAS PHARMA INC. (50.0%)
5-1, Nihonbashi-Honcho 2-chome, Chuo-ku
Tokyo 103-8411, JP y
TRON - TRANSLATIONALE ONKOLOGIE AN DER
UNIVERSITÄTSMEDIZIN DER JOHANNES
GUTENBERG- UNIVERSITÄT MAINZ
GEMEINNÜTZIGE GMBH (50.0%)

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
BRANDENBURG, GUNDA y
USENER, DIRK

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 675 375 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra claudina 18 para el tratamiento del cáncer

Las terapias basadas en anticuerpos para el cáncer tienen el potencial de una mayor especificidad y un menor perfil de efectos secundarios en comparación con los fármacos convencionales. La razón es una distinción precisa entre células normales y neoplásicas por anticuerpos y el hecho de que su modo de acción se basa en mecanismos antitumorales inmunológicos menos tóxicos, como la activación del complemento y el reclutamiento de células inmunes citotóxicas.

Las dianas para las terapias basadas en anticuerpos deben tener cualidades particulares, que forman la base para una discriminación adecuada entre células normales y neoplásicas. Obviamente, una diana con restricción exclusiva a células tumorales y totalmente indetectable en tejidos normales es ideal para el desarrollo de agentes terapéuticos de anticuerpos eficientes y seguros. En otro aspecto, una sobreexpresión de alto nivel puede ser la base de la ventana terapéutica y efectos secundarios bajos ejemplificados por el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER-2), que como resultado de la amplificación genética es una buena diana para el anticuerpo trastuzumab (Herceptin).

Otras dianas para anticuerpos que ya están aprobadas o en desarrollo clínico para terapia tumoral tienen cualidades distintas, que no se basan en una sobreexpresión numérica de moléculas diana en células tumorales. En el caso de anticuerpos contra el proteoglicano MUC-1, un epítipo de repetición de péptido en la cadena principal de la diana está subglicosilado en las células tumorales y, por lo tanto, alterado a su homólogo normal. En el caso de anticuerpos contra CD20 (rituximab), CD52 (Campath-1H) y CD22 (epratuzumab), las dianas de anticuerpos tienen niveles de expresión comparables en células tumorales y linfocitos normales. Aquí, la ablación de células normales por el anticuerpo es tolerable ya que las células madre negativas diana restablecen el repertorio normal de linfocitos. Otros ejemplos de accesibilidad diferencial de las dianas de anticuerpos son el antígeno carcinoembrionario (CEA) y la carboanhidrasa IX (CA9). Ambos antígenos se expresan en epitelios normales de colon y riñón, respectivamente. Sin embargo, los anticuerpos en generación de imágenes marcados radiactivamente distinguen bien entre el tumor y el tejido normal, y los anticuerpos citotóxicos son bien tolerados. Esto es debido muy probablemente a una expresión restringida de CA9 y CEA en el lado luminal del tejido epitelial normal donde los anticuerpos IgG no tienen acceso. También la molécula de adhesión de células epiteliales antigénicas (Ep-CAM) pertenece a esta categoría. Como molécula de adhesión celular homotípica para células epiteliales, se localiza en el espacio intercelular. Curiosamente, mientras que los anticuerpos anti-Ep-CAM de alta afinidad son muy tóxicos, los anticuerpos de afinidad intermedia son bien tolerados. Esto sugiere accesibilidad de la diana Ep-CAM en células normales, pero también indica que la cinética de unión del anticuerpo puede abrir una ventana terapéutica.

Una posibilidad es que otras proteínas específicas de células epiteliales implicadas en la adhesión célula/célula también puedan ser atractivas para las metodologías de anticuerpos, ya que pueden ser apenas accesibles en epitelios bien estructurados a anticuerpos, pero quedan expuestas en las células tumorales. Por lo tanto, hemos analizado las proteínas implicadas en la organización de la arquitectura del tejido epitelial en cuanto a su idoneidad como objetivos de anticuerpos terapéuticos. Una proteína, que particularmente atrajo nuestra atención es la claudina 18.

La molécula de claudina 18 (CLD18) (número de acceso de Genbank: variante de corte y empalme 1 (CLD18A1): NP_057453, NM_016369 y variante de corte y empalme 2 (CLD18A2): NM_001002026, NP_001002026) es una proteína transmembrana integral con un peso molecular de aproximadamente 27.9/27.72 kD. Las claudinas son proteínas integrales de membrana localizadas dentro de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Las uniones estrechas organizan una red de cadenas interconectadas de partículas intramembranas entre células adyacentes. En las uniones estrechas, la claudina y las claudinas son los componentes proteicos transmembrana más prominentes. Debido a sus propiedades de fuerte adhesión intercelular, crean una barrera primaria para prevenir y controlar el transporte paracelular de solutos y restringir la difusión lateral de lípidos y proteínas de la membrana para mantener la polaridad celular. Las proteínas que forman uniones estrechas están críticamente involucradas en la organización de la arquitectura del tejido epitelial. Supusimos que tales proteínas pueden ser apenas accesibles para los anticuerpos en epitelios bien estructurados, pero se exponen a las células tumorales.

La CLD18 es un tetraspanina y tiene como tal 4 regiones hidrófobas. Hemos generado datos que indican que la CLD18 muestra varias conformaciones diferentes, que pueden ser abordadas selectivamente por anticuerpos. Una conformación (CLD18-Conformación-1) indica, que las cuatro regiones hidrófobas sirven como dominios regulares transmembrana (TM) y dos bucles extracelulares (bucle 1 abrazado por región hidrófoba 1 y región hidrófoba 2; se forma bucle 2 abarcado por regiones hidrófobas 3 y 4), como se describe para la gran mayoría de los miembros de la familia de la claudina. Una segunda conformación (CLD18-Conformación-2) implica que, como se describe para PMP22, otro miembro de la familia tetraspanina (Taylor et al, J. Neurosc Res. 62: 15-27, 2000), el segundo y tercer dominios hidrófobos no cruzan completamente la membrana plasmática de modo que la porción (bucle D3) entre el primer y el cuarto dominio transmembrana es extracelular. Una tercera conformación (CLD18-Conformación-3) implica un gran dominio extracelular con dos regiones hidrófobas internas abarcadas por la primera y cuarta región hidrófoba, que sirven como dominios transmembrana regulares. Debido a la presencia del sitio de N-glicosilación clásica en bucle D3, las variantes de topología Claudina 18 CLD18 topología-2 y CLD18 topología-3 albergan un sitio extracelular de N-glicosilación.

Se añade otro nivel de complejidad a la molécula de la CLD18 mediante la presencia de dos variantes de corte y empalme diferentes, que se describen en ratón y en humano (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001). Las variantes de corte y empalme CLD18A1 y CLD18A2 difieren en los primeros 21 aminoácidos N-terminales, que comprenden el primer TM y el bucle 1, mientras que la secuencia de proteína primaria del extremo C es idéntica.

5 El documento WO2004047863 describe la identificación de las variantes de corte y empalme CLD18A1 y CLD18A2 como dianas de diagnóstico y terapéuticas para cáncer. La CLD18A1 se expresa selectivamente en epitelios pulmonar y estomacal normales, mientras que la CLD18A2 se expresa solo en células gástricas (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001). Lo que es más importante, la CLD18A2 está restringida a las células de corta duración diferenciadas del epitelio del estómago, pero está desprovista de la región de las células madre gástricas. Utilizando RT-PCR sensible, hemos demostrado que ambas variantes no son detectables en absoluto en ningún otro órgano humano normal, pero se expresan de forma robusta en varios tipos de cáncer, incluidos tumores estomacales, esofágicos, pancreáticos y pulmonares, así como líneas celulares cancerosas humanas. La expresión es más prominente en los subtipos de adenocarcinoma de estas indicaciones.

15 El peso molecular de la proteína difiere en algunos cánceres y tejidos normales adyacentes. La proteína de peso molecular más alto observado en el tejido sano puede ser transferida en el mismo peso molecular como se observa en cáncer mediante el tratamiento de los lisados de tejido con el compuesto de desglucosilación PNGasa F. Esto sugiere, que la CLD18 es menos N-glicosilada en el cáncer en comparación con su tejido normal contrapartida. Es probable que esta diferencia estructural dé lugar a un epítipo alterado. Un motivo clásico de N-glicosilación está en la posición aa 116 dentro del dominio bucle D3 de la molécula.

20 Los términos "CLD18" y "variante de la CLD18" de acuerdo con la invención abarcarán (i) variantes de corte y empalme CLD18, (ii) variantes de la CLD18-N-glicosilación, (iii) variantes de conformación de la CLD18, (iv) variantes libres de la CLD18 y homotípicamente/heterotípicamente asociadas localizadas en uniones estrechas intercelulares y (v) variantes relacionadas con cáncer por CLD18 y relacionadas con células CLD18-no cancerosas.

25 Las características moleculares y funcionales de la CLD18 hacen de esta molécula una diana muy interesante para la terapia del cáncer basada en anticuerpos. Estas son en particular (i) la ausencia de la CLD18 de la gran mayoría de los tejidos normales relevantes para toxicidad, (ii) la restricción de la expresión de la variante de la CLD18A2 a una población de células dispensables como células gástricas diferenciadas, que pueden reponerse mediante células madre negativas diana del estómago, (iii) insinúa una posible glicosilación diferencial entre células normales y neoplásicas, y (iv) la presencia de diferentes topologías conformacionales. Por otra parte, el papel de la CLD18 como proteína de unión estrecha puede contribuir aún más a una buena ventana terapéutica. Debido a que las células tumorales expresan claudinas pero a menudo no forman uniones estrechas clásicas por asociación homotípica y heterotípica de claudinas como se encuentran en el tejido epitelial normal, las células tumorales pueden tener un conjunto considerable de claudina libre que es susceptible de unión e inmunoterapia con anticuerpos extracelulares. Es posible que los epítipos de unión de claudinas en el epitelio sano estén protegidos dentro de uniones estrechas frente al acceso por tales anticuerpos.

35 Además, la elevada expresión de la membrana plasmática observada de acuerdo con la invención no solo para tumores primarios sino también para metástasis derivadas de la CLD18A2 que expresan tumores primarios, en particular, tumores gástricos, hacen que los anticuerpos específicos CLD18A2 sean una herramienta valiosa para la prevención, tratamiento y/o diagnóstico de metástasis de cáncer, en particular metástasis derivadas de tumores gástricos, tales como metástasis a nódulos linfáticos, metástasis peritoneales y tumores de Krukenberg.

40 El objeto de la invención es proporcionar anticuerpos para su uso en la prevención o el tratamiento de un tumor de Krukenberg.

Sumario de la invención

45 La presente invención en general proporciona anticuerpos para prevenir o tratar un tumor de Krukenberg. La invención se define adicionalmente por las reivindicaciones.

50 En un aspecto, la presente descripción se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLD18. Preferiblemente, el anticuerpo tiene la capacidad de unirse a CLD18 expresada en la superficie celular y preferiblemente se une a uno o más epítipos localizados dentro de las porciones extracelulares de la CLD18, preferiblemente dentro del primer dominio extracelular (posiciones de aminoácidos 29 a 78 de la CLD18). Preferiblemente, el anticuerpo descrito en este documento se une a uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 151, 153, 155, 156 y 157. Preferentemente, el anticuerpo se une a células cancerosas, en particular células de los tipos de cáncer mencionados anteriormente y, preferiblemente, no se une sustancialmente a células no cancerosas. Preferiblemente, la unión de dicho anticuerpo a células que expresan CLD18, tales como células cancerosas, media la destrucción de células que expresan CLD18. Preferiblemente, el anticuerpo se une a CLD18A1 y CLD18A2 y más preferiblemente se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1. Preferiblemente, los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a y son específicos para el bucle 1 o el bucle 2 de la conformación CLD-1. En realizaciones preferidas adicionales, el anticuerpo descrito en este documento se une y es específico para bucle D3 de CLD-conformación-2 y, en particular, se une en o alrededor de un potencial sitio de N-glicosilación en la posición

116 dentro del bucle D3. En realizaciones adicionales, el anticuerpo descrito en este documento es específico para la forma no glicosilada del sitio potencial de N-glicosilación en la posición 116 dentro del bucle D3.

Preferiblemente, la unión de anticuerpos descritos aquí a CLD18A2 implica uno o más aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en Ala en la posición 42, Asn en la posición 45 y Glu en la posición 56 de la CLD18A2 (SEQ ID NO: 2). Preferiblemente, los anticuerpos no se unen a variantes de la CLD18A2 o fragmentos de las mismas, en donde uno o más, preferiblemente todos los aminoácidos en estas posiciones son reemplazados por un aminoácido diferente, en particular por aquellos aminoácidos encontrados en las posiciones correspondientes dentro de la CLD18A1 (SEQ ID NO: 8) (Ala42Ser, Asn45Gln y Glu56Gln).

La destrucción de células por el anticuerpo de la invención se induce preferiblemente mediante la unión del anticuerpo a CLD18 expresada por dichas células, más preferiblemente mediante la unión del anticuerpo a CLD18A2 expresada por dichas células. En una realización, la unión del anticuerpo de la invención a CLD18A1 expresada por dichas células no induce la muerte de dichas células. Tal destrucción de células se puede utilizar terapéuticamente como se describe en este documento. En particular, la destrucción de células puede utilizarse para tratar o prevenir el cáncer, en particular metástasis de cáncer y la diseminación metastásica de células cancerosas.

Las células que expresan CLD18 son preferiblemente células cancerosas y, en particular, se seleccionan del grupo que consiste en células cancerosas gástricas tumorigénicas, esofágicas, pancreáticas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

Preferiblemente, el anticuerpo de la invención media en la muerte de células induciendo citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por anticuerpos, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.

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

Preferiblemente, la lisis de células mediada por ADCC tiene lugar en presencia de células efectoras, que en realizaciones particulares se seleccionan del grupo que consiste en monocitos, células mononucleares, células NK y PMN, y la fagocitosis es por macrófagos.

El anticuerpo de la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo y se puede seleccionar del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgA secretora, una IgD y un anticuerpo IgE.

De acuerdo con todos los aspectos de la presente descripción, CLD18 es preferiblemente CLD18 humana, preferiblemente CLD18A2 humana, y CLD18A2 preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 2 y CLD18A1 preferiblemente tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 8.

En realizaciones preferidas particulares, el anticuerpo de la invención se une a epítopos nativos de la CLD18 presentes en la superficie de células vivas. En realizaciones preferidas adicionales, el anticuerpo de la invención es específico para células cancerosas, preferiblemente células de cáncer de estómago.

En ciertas realizaciones de la invención, CLD18 se expresa en la superficie de las células.

Los anticuerpos de la invención se pueden obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20, 21-23, 26-31, 151, 153 y 155-157 o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo, o un ácido nucleico o célula huésped que exprese dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico o derivado del mismo. Preferiblemente, un anticuerpo de la invención es específico para las proteínas, péptidos o fragmentos inmunogénicos o derivados anteriormente mencionados de los mismos. En el contexto de una proteína o péptido usado en la inmunización, un derivado se refiere a una variante de dicha proteína o péptido que tiene las mismas o similares propiedades inmunogénicas que la proteína o péptido del que se deriva. En particular, el derivado de una proteína o péptido cuando se usa en la inmunización para la producción de anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, proporciona anticuerpos que tienen la misma especificidad que los anticuerpos obtenidos cuando se usa la proteína o el péptido en la inmunización. Por ejemplo, tal derivado puede incluir la eliminación, sustitución o adición de uno o más aminoácidos. En particular, puede incluir la adición de uno o más aminoácidos tales como cisteína en el extremo N o el extremo C o ambos, o la sustitución de restos de cisteína por residuos de serina. Los datos presentados en este documento descubren aminoácidos dentro de la CLD18 que no son críticos para la unión del anticuerpo. Por consiguiente, las proteínas CLD, péptidos, fragmentos inmunogénicos de los mismos o derivados de los mismos como se describen en el presente documento usados para inmunización pueden incorporar una o más sustituciones de aminoácidos en dichas posiciones de aminoácidos que no son críticas para la unión de anticuerpos.

En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la invención se produce mediante Un clon que tiene el No. de acceso. DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-

D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294) o DSM ACC2810 (182-D1106-362).

En una realización, el anticuerpo de la invención se acopla a un agente terapéutico tal como una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.

- 5 En un aspecto adicional, la invención se refiere a un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la invención. Los hibridomas preferidos son aquellos que tienen el No. de acceso. DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294) o DSM ACC2810 (182-D1106-362).

Los anticuerpos de la invención se designan aquí haciendo referencia a la designación del anticuerpo, por ejemplo 182-D758-035, y/o haciendo referencia al clon que produce el anticuerpo, por ejemplo 26D12.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de la invención y/o un conjugado del mismo con un agente terapéutico y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 En otro aspecto, la presente enseñanza se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o destrucción de una célula que expresa CLD18, preferiblemente CLD18A2, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la invención y/o un conjugado de la misma con un agente terapéutico. La CLD18 se expresa preferiblemente en la superficie de dicha célula.

- 20 En otro aspecto, la enseñanza divulgada se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo de la invención, un conjugado del mismo con un agente terapéutico, o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la invención o el conjugado del mismo con un agente terapéutico. Preferiblemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores y en realizaciones particulares se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de la vesícula biliar, y las metástasis que se originan a partir de los mismos. La CLD18 se expresa preferiblemente en la superficie de dichas células.

- 25 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen la capacidad de discriminar variantes de la CLD18 expresadas por diferentes tipos de células que incluyen células cancerosas y células no malignas. En una realización particularmente preferida, los anticuerpos de la invención tienen la capacidad de unirse a CLD18A2 mientras que no se unen a CLD18A1, o se unen a CLD18A1 con una especificidad menor en comparación con la especificidad de unión a CLD18A2.

- 30 El término "unión" de acuerdo con la invención preferiblemente se refiere a una unión específica. "Unión específica" significa que un agente tal como un anticuerpo se une más fuertemente a una diana tal como un epítipo para el que es específico en comparación con la unión a otra diana. Un agente se une más fuerte a una primera diana en comparación con una segunda diana si se une a la primera diana con una constante de disociación (K_D) que es menor que la constante de disociación para la segunda diana. Preferiblemente, la constante de disociación (K_D) para la diana a la que el agente se une específicamente es más de 10 veces, preferiblemente más de 20 veces, más preferiblemente más de 50 veces, incluso más preferiblemente más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (K_D) para la diana a la que el agente no se une específicamente.

- 40 Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen una constante de disociación para CLD18, preferiblemente CLD18A2 que es 10^{-6} M o menos, preferiblemente 10^{-7} M o menos, preferiblemente 10^{-8} M o menos, o preferiblemente 10^{-9} M o menos. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención tienen una constante de disociación para CLD18, preferiblemente CLD18A2 que está en el intervalo de 10^{-8} M a 10^{-9} M.

- 45 Los anticuerpos de la invención median en la destrucción de células que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, uniéndose a CLD18, preferiblemente expresadas en la superficie de dichas células. En una realización, los anticuerpos de la invención inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por ejemplo, al menos aproximadamente 20-40% de lisis mediada por CDC, preferiblemente aproximadamente 40-50% de lisis mediada por CDC, y más preferiblemente más de 50% de lisis mediada por CDC de células que expresan CLD18. Dichos anticuerpos se ejemplifican en el presente documento por los siguientes anticuerpos: 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 163E12, 175D10, 45C1, 125E1, ch-163E12 y ch-175D10. Alternativamente o además de inducir CDC, los anticuerpos de la invención pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CLD18 en presencia de células efectoras (por ejemplo, monocitos, células mononucleares, células NK y PMN). Dichos anticuerpos se ejemplifican en el presente documento mediante los siguientes anticuerpos: 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 42E12, 163E12, 175D10, 45C1 y 125E1. Los anticuerpos de la invención pueden tener la capacidad de inducir apoptosis de células que expresan CLD18, inducir la adhesión homotípica de células que expresan CLD18 y/o inducir fagocitosis de células que expresan CLD18 en presencia de macrófagos. Los anticuerpos de la invención pueden tener una o más de las propiedades funcionales descritas anteriormente. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención inducen la lisis mediada por CDC y la lisis

mediada por ADCC de células que expresan CLD18 y más preferiblemente inducen la lisis mediada por ADCC de células que expresan CLD18 mientras que no inducen la lisis mediada por CDC de dichas células. Células diana de ejemplo para los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, células cancerosas que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, tales como células tumorales gástricas, pancreáticas, esofágicas y de cáncer de pulmón. En una realización preferida particular, la destrucción de células mediada por anticuerpos de la invención es específica de la CLD18A2, es decir, los anticuerpos de la invención median en la destrucción de células, preferiblemente lisis de células mediada por CDC y/o ADCC, que expresan CLD18A2 pero no median en la muerte de células que expresan CLD18A1 pero no expresan CLD18A2. Los anticuerpos descritos anteriormente pueden usarse para mediar la muerte de células tumorales en el tratamiento o prevención de cáncer como cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de la vesícula biliar y/o sus metástasis.

Los anticuerpos de la invención se pueden categorizar en clases distintas de acuerdo con sus propiedades de unión y su capacidad para mediar en la función efectora en células que expresan CLD18. Los anticuerpos de la invención se pueden categorizar de acuerdo con sus

- 15 ● propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células que expresan CLD18A1 o CLD18A2 (discriminación de variantes de corte y empalme CLD18),
- propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células que expresan variantes de la CLD18 glicosiladas o no glicosiladas (discriminación entre variantes de la CLD18 con y sin N-glucosilación),
- 20 ● propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células cancerosas o tipos de células normales (discriminación entre variantes de la CLD18 expresadas por células tumorales o células normales no malignas),
- propiedades de unión a epítopos CLD18 enmascarados por la formación de uniones estrechas,
- habilidades para inducir la formación de agregados de la CLD18 en células vivas, y habilidades para unir una variante de la CLD18 no humana, particularmente variantes CLD18 de ratones, ratas, conejos y primates.

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

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

Como se ejemplifica aquí, los anticuerpos de la invención abarcan además moléculas, que

- a) se unen a las células diferenciadas del estómago normal, pero no a las células madre del estómago (por ejemplo, 39F11)
- 45 b) no se unen al tejido gástrico normal, así como a otros órganos normales, sino exclusivamente a las células cancerosas (por ejemplo, 26B5)
- c) se une a un epítipo que abarca una Asn no glicosilada en la posición 116 de la CLD18
- d) se unen a CLD18 humana y a ratón, lo que permite realizar estudios preclínicos de toxicidad en ratones.

Los anticuerpos de la invención se pueden derivar de diferentes especies, que incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata, conejo, cobaya y humano. Los anticuerpos de la invención también incluyen moléculas quiméricas en las que

una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferiblemente humana, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos de la invención incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígeno de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con regiones constantes y estructurales de origen humano.

- 5 Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales e incluyen anticuerpos IgG2a (por ejemplo, IgG2a, κ , λ), IgG2b (por ejemplo, IgG2b, κ , λ), IgG3 (por ejemplo, IgG3, κ , λ) e IgM. Sin embargo, la invención también abarca otros isotipos de anticuerpos, que incluyen anticuerpos IgG1, IgA1, IgA2, IgA secretora, IgD e IgE. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos que incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla o anticuerpos biespecíficos. Además, los fragmentos de unión a antígeno incluyen proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión (tal como una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena liviana) que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante CH2 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región bisagra, y (iii) una región constante CH3 de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región constante CH2. Dichas proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US2003/0118592 y US 2003/0133939.

Los anticuerpos de la presente invención preferiblemente se disocian de la CLD18 con una constante de equilibrio de disociación (KD) de aproximadamente 1-100 nM o menos. Preferiblemente, los anticuerpos de la invención no reaccionan de forma cruzada con antígenos de superficie celular relacionados y, por lo tanto, no inhiben su función.

- 20 En realizaciones preferidas, los anticuerpos desvelados en el presente documento se pueden caracterizar por una o más de las siguientes propiedades:

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

- Los anticuerpos anti-CLD18 de la presente divulgación pueden derivarse, unirse o coexpresarse a otras especificidades de unión. En una realización particular, la invención proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para CLD18 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CLD18 o mimético de la misma) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor de Fc (por ejemplo, un receptor de Fc-gamma, tal como Fc-gamma RI, o cualquier otro receptor de Fc) o un receptor de células T, por ejemplo, CD3.

- 40 De acuerdo con lo anterior, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CLD18 como a un receptor de Fc o un receptor de células T, por ejemplo CD3. Ejemplos de receptores de Fc son receptor de IgG, receptor de Fc-gamma (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Otros receptores de Fc, como los receptores de IgA (por ejemplo, Fc α RI), también pueden ser direccionados. El receptor de Fc está situado preferiblemente en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, macrófago o una célula mononuclear activada. En una realización preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor de Fc en un sitio que es distinto del sitio de unión del receptor a la inmunoglobulina Fc (por ejemplo, IgG o IgA). Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no está bloqueada por niveles fisiológicos de inmunoglobulinas.

- 50 En otro aspecto más, los anticuerpos anti-CLD18 de la enseñanza se derivan, unen o expresan conjuntamente con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la presente enseñanza puede vincularse funcionalmente (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo, para producir un inmunoc conjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente

enseñanza se puede unir a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticancerígeno de molécula pequeña, una citoquina recombinante o quimioquina. Por consiguiente, la presente enseñanza abarca una gran variedad de conjugados de anticuerpos, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, todas las cuales se unen a células que expresan CLD18 y que pueden usarse para direccionar otras moléculas a tales células.

En un aspecto adicional, la invención también prevé proteínas de unión a CLD18 derivadas de dominios no inmunoglobulínicos, en particular proteínas de cadena sencilla. Tales proteínas de unión y métodos para su producción se describen, por ejemplo, en Binz et al. (2005) Nature Biotechnology 23 (10): 1257-1268. Debe entenderse que la enseñanza dada en el presente documento con respecto a las moléculas de unión de inmunoglobulina o derivadas de inmunoglobulina se aplica también a moléculas de unión derivadas de dominios que no son inmunoglobulinas. En particular, usando tales moléculas de unión derivadas de dominios no inmunoglobulínicos es posible bloquear CLD18 de células que expresan dicho objetivo y así, producir efectos terapéuticos como se describe aquí para anticuerpos de la invención, en particular la inhibición de la proliferación de células tumorales. Aunque no es obligatorio, es posible conferir funciones efectoras de anticuerpos a tales moléculas que no se unen a inmunoglobulinas por ejemplo fusión a la región Fc de anticuerpos.

En otro aspecto más, la presente divulgación proporciona composiciones, por ejemplo, composiciones/kits farmacéuticos y de diagnóstico, que comprenden un vehículo farmacéuticamente aceptable formulado junto con uno o una combinación de anticuerpos de la invención. En una realización particular, la composición incluye una combinación de anticuerpos que se unen a epítomos distintos o que poseen características funcionales distintas, tales como inducir CDC y/o ADCC e inducir apoptosis. En esta realización, los anticuerpos pueden usarse en combinación, por ejemplo, como una composición farmacéutica que comprende dos o más anticuerpos monoclonales anti-CLD18. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLD18 que tienen actividades diferentes pero complementarias se pueden combinar en una sola terapia para lograr un efecto terapéutico deseado. En una realización preferida, la composición incluye un anticuerpo anti-CLD18 que media CDC combinado con otro anticuerpo anti-CLD18 que induce la apoptosis. En otra realización, la composición incluye un anticuerpo anti-CLD18 que media la destrucción altamente efectiva de células diana en presencia de células efectoras, combinado con otro anticuerpo anti-CLD18 que inhibe el crecimiento de células que expresan CLD18.

La presente enseñanza también incluye la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-CLD18 de la invención, en donde al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo quimérico anti-CLD18 y al menos otro anticuerpo es un anticuerpo anti-CLD18 humano, los anticuerpos que se unen al epítipo igual o diferente de la CLD18. Preferiblemente, se administra primero un anticuerpo quimérico CLD18 de la invención seguido de la administración de un anticuerpo anti-CLD18 humano de la invención, en donde el anticuerpo anti-CLD18 humano se administra preferiblemente durante un período de tiempo prolongado, es decir, como terapia de mantenimiento.

Generalmente, los anticuerpos, inmunoconjugados, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y composiciones descritas en el presente documento pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 y/o matar selectivamente células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 poniendo en contacto las células con una cantidad efectiva del anticuerpo, inmunoconjugado, molécula o composición biespecífica/multiespecífica, de manera que se inhibe el crecimiento de la célula y/o se destruye la célula. En una realización, el método incluye matar la célula que expresa CLD18, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo, mediante CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o mediante una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan CLD18 que pueden inhibirse o eliminarse usando los anticuerpos de la invención incluyen células cancerígenas tales como células tumorales de estómago, páncreas, esofágicas, pulmonares, ováricas, de colon, hepáticas, de cabeza y cuello y de vesícula biliar.

De acuerdo con lo anterior, los anticuerpos de la presente invención pueden usarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades que implican células que expresan CLD18 administrando los anticuerpos a pacientes que padecen tales enfermedades. Enfermedades a modo de ejemplo que se pueden tratar (por ejemplo, mejorar) o prevenir incluyen, pero no se limitan a, enfermedades tumorigénicas. Ejemplos de enfermedades tumorigénicas, que se pueden tratar y/o prevenir incluyen cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de la vesícula biliar, y sus metástasis.

En una realización particular, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente quimioterapéutico, radiación o un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de un receptor de Fc, por ejemplo un receptor Fc-gamma, tal como una citoquina. Las citoquinas típicas para administración durante el tratamiento incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Los agentes terapéuticos típicos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como doxorubicina, cisplatino, taxotere, 5-fluoruracilo, metotrexato, gemcitabina y ciclofosfamida.

En otro aspecto más, la presente enseñanza se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos tales como ratones con CLD18 humana o un fragmento peptídico de los mismos, preferiblemente CLD18A2 o un fragmento peptídico de los mismos para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son

aquellos seleccionados del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23, 26-31, 151, 153 y 155-157, o péptidos que comprenden dichas secuencias. Por consiguiente, en realizaciones preferidas, los anticuerpos de la invención son los obtenidos por inmunización usando péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23, 26-31, 151, 153, y 155-157, o usando péptidos que comprenden dichas secuencias.

5 Análogamente, se pueden generar anticuerpos contra CLD18 en un animal transgénico no humano, tal como un ratón transgénico. El animal transgénico no humano puede ser un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena liviana que codifica todo o una porción de un anticuerpo.

Se pueden inmunizar animales de tipo salvaje así como animales no humanos transgénicos con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CLD18 y/o ácidos nucleicos y/o células que expresan CLD18 o un fragmento peptídico de los mismos. Preferiblemente, el animal no humano, es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLD18 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) experimentando la recombinación V-D-J y la conmutación de isotipo. La conmutación de isotipo puede producirse, por ejemplo, mediante la conmutación de isotipo clásica o no clásica.

10

De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto más, la presente enseñanza proporciona células B aisladas de un animal no humano como se describió anteriormente. Las células B aisladas pueden inmortalizarse entonces por fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos de la invención. Dichos hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la invención) también se incluyen dentro del alcance de la invención.

15

Como se ejemplifica aquí, los anticuerpos de la invención se pueden obtener directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o se pueden clonar y expresar de forma recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son microorganismos, tales como E. coli, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse de forma recombinante en un animal o planta transgénica no humana.

20

Las células de hibridoma preferidas para producir anticuerpos descritos en el presente documento son aquellas secuenciadas o depositadas en DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Alemania, nueva dirección: Inhoffenstr.7B, 31824 Braunschweig, Alemania) con las siguientes designaciones y números de acceso:

25

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

Los anticuerpos preferidos descritos en este documento son aquellos producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas descritos anteriormente; es decir 37G11 en el caso de 182-D1106-055, 37H8 en el caso de 182-D1106-056, 38G5 en el caso de 182-D1106-057, 38H3 en el caso de 182-D1106-058, 39F11 en el caso de 182-D1106-059, 43A11 en el caso de 182-D1106-062, 61C2 en el caso de 182-D1106-067, 26B5 en el caso de 182-D758-035, 26D12 en el caso de 182-D758-036, 28D10 en el caso de 182-D758-040, 42E12 en el caso de 182-D1106-061, 125E1 en el caso de 182-D1106-279, 163E12 en el caso de 182-D1106-294, y 175D10 en el caso de 182-D1106-362; y las formas quimerizadas y humanizadas de los mismos.

45

En las realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos según la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena pesada (CH) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena pesada humana tal como la secuencia de

50

aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 o 150 o un fragmento del mismo. En otras realizaciones preferidas, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos según la invención incluyen anticuerpos que comprenden una región constante de cadena liviana (CL) que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una región constante de cadena liviana humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 41 o 148 o un fragmento del mismo. En una realización preferida particular, los anticuerpos, en particular las formas quimerizadas de anticuerpos de acuerdo con la invención incluyen anticuerpos que comprenden Una CH que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de Una CH humano tal como la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 o 150 o un fragmento del mismo y que comprende Una CL que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de una CL humana tal como la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 41 o 148 o un fragmento de la misma.

Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 46 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 45. Una CH que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 150 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 149. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 41 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 40. Una CL que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 148 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 147.

En ciertas realizaciones preferidas, las formas quimerizadas de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118, 119, 120, y un fragmento de la misma y/o que comprende una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, y un fragmento de la misma.

En ciertas realizaciones preferidas, las formas quimerizadas de anticuerpos incluyen anticuerpos que comprenden una combinación de cadenas pesadas y cadenas livianas seleccionadas de las siguientes posibilidades (i) a (ix):

(i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 115 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 122 o un fragmento de la misma,

(ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 116 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 121 o un fragmento de la misma,

(iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 117 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 123 o un fragmento de la misma,

(iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 119 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 126 o un fragmento de la misma,

(v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 118 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 125 o un fragmento de la misma,

(vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 124 o un fragmento de la misma,

(vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 127 o un fragmento de la misma,

(viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 128 o un fragmento de la misma, y

(ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 o un fragmento de la misma y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 129 o un fragmento de la misma.

"Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se usa más arriba se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpo, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpo acortada en el extremo N y/o C, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpo en un anticuerpo conserva la unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferiblemente funciones de dicho anticuerpo como se describe aquí, por ejemplo, lisis mediada por CDC

o lisis mediada por ADCC. Preferiblemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 y 129 se refiere preferiblemente a dicha secuencia en la que se eliminan 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoácidos en el extremo N-terminal. Los fragmentos de las secuencias de aminoácidos descritas en este documento pueden estar codificados por fragmentos respectivos de secuencias de ácido nucleico que codifican dichas secuencias de aminoácidos.

Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 115 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 100.
 Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 116 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 101.
 Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 117 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 102.
 Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 119 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 104.
 Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por La SEQ ID NO: 118 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 103.
 Una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 105.

Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 122 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 107.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 121 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 106.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 123 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representado por SEQ ID NO: 108.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 126 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 111.
 Una cadena liviana que comprende un aminoácido la secuencia representada por SEQ ID NO: 125 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 110.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 124 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 109.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 127 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 112.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 128 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 113.
 Una cadena liviana que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 129 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 114.

En una realización preferida, el anticuerpo descrito en este documento comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135, 136, 137 y un fragmento de la misma.

En una realización preferida, el anticuerpo descrito en este documento comprende una región variable de cadena liviana (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, y un fragmento del mismo.

En ciertas realizaciones preferidas, el anticuerpo descrito en este documento comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena liviana (VL) seleccionada entre las siguientes posibilidades (i) a (ix):

(i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 132 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 139 o un fragmento de la misma,

(ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 133 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 138 o un fragmento de la misma,

(iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 134 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 140 o un fragmento de la misma,

(iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 136 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 143 o un fragmento de la misma,

(v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 142 o un fragmento de la misma,

(vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 141 o un fragmento de la misma,

(vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 o un fragmento de la misma,

5 (viii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145 o un fragmento de la misma,

(ix) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146 o un fragmento de la misma.

10 Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 132 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 55. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 133 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 56. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 134 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 57. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 136 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 59. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 58. Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representa por la SEQ ID NO: 60.

20 Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 139 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 62. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 138 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 61. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 140 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 63. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 143 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 66. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 142 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por la SEQ ID NO: 65. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 141 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 64. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 67. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145 puede estar codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 68. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146 puede estar codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representado por SEQ ID NO: 69.

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención comprende una VH que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (vi):

40 (i) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de SEQ ID NO: 115,

(ii) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 116,

45 (iii) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de SEQ ID NO: 117,

(iv) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 118, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 118, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 118,

(v) CDR1: posiciones 44-51 de SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de SEQ ID NO: 119, y

50 (vi) CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120.

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

55 (i) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 121,

ES 2 675 375 T3

(ii) CDR1: posiciones 49-53 de SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de SEQ ID NO: 122,

(iii) CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 123,

5 (iv) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 124, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 124, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 124,

(v) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 125, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 125, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 125,

10 (vi) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de SEQ ID NO: 126,

(vii) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 127, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 127, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 127,

(viii) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 128, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 128, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 128, y

15 (ix) CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 129, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 129, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 129.

En una realización preferida, un anticuerpo de la invención comprende una combinación de VH y VL que comprende cada una un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (ix):

20 (i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de SEQ ID NO: 115, VL: CDR1: posiciones 49-53 de SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de SEQ ID NO: 122,

25 (ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 116, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 121,

(iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de SEQ ID NO: 117, VL: CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 123,

30 (iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de SEQ ID NO: 119, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de SEQ ID NO: 126,

(v) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 118, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 118, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 118, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 125, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 125, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 125,

35 (vi) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 124, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 124, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 124,

40 (vii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 127, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 127, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 127,

(viii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 128, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 128, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 128, y

45 (ix) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 129, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 129, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 129.

En realizaciones preferidas adicionales, un anticuerpo de la presente enseñanza comprende preferiblemente una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena liviana (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18, preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 descrito en este documento, y preferiblemente comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, regiones variables de cadena pesada (VH) y/o regiones variables de cadena liviana

50

- (VL) descritas aquí. En una realización, dicha una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 descritas en este documento. En una realización particularmente preferida, un anticuerpo de la invención comprende preferiblemente las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena liviana (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 , preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 descrito en este documento, y comprende preferiblemente las regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 de las regiones variables de cadena pesada (VH) y/o las regiones variables de cadena liviana (VL) descritas en este documento.
- En una realización, un anticuerpo de la enseñanza que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en el presente documento comprende dichas CDR junto con sus regiones marco intervinientes. Preferiblemente, la parte también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas de las regiones marco primera y cuarta, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región marco y el 50% N-terminal de la cuarta región marco. La construcción de anticuerpos de la presente invención realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N- o C-terminales en las regiones variables codificadas por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluida la introducción de enlazadores para unir regiones variables de la invención para secuencias de proteínas adicionales que incluyen cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcadores de proteínas.
- En una realización, un anticuerpo de la enseñanza que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe en este documento comprende dichas CDR en un marco de anticuerpo humano.
- La referencia en el presente documento a un anticuerpo que comprende con respecto a la cadena pesada del mismo una cadena particular, o una región o secuencia particular preferiblemente se refiere a la situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica de manera correspondiente a la cadena liviana de un anticuerpo.
- La presente enseñanza también se refiere a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo una cadena de anticuerpo, como se describe en este documento. Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado, por ejemplo convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender otros genes tales como genes marcadores que permiten la selección del vector en una célula huésped adecuada y en condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de la expresión que permiten la expresión adecuada de las regiones de codificación en huéspedes adecuados. Dichos elementos de control son conocidos por el técnico y pueden incluir un promotor, un casete de corte y empalme y un codón de iniciación de la traducción.
- Preferiblemente, el ácido nucleico se une operativamente a las secuencias de control de la expresión anteriores permitiendo la expresión en células eucariotas o procariotas. Los elementos de control que aseguran la expresión en células eucariotas o procariotas son bien conocidos por los expertos en la técnica.
- Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente enseñanza, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células huésped elegidas apropiadamente, para causar o lograr la expresión, son bien conocidos en la técnica.
- Un aspecto adicional de la presente enseñanza se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o vector como se describe en este documento.
- Otras características y ventajas de la enseñanza instantánea serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.
- Breve descripción de los dibujos
- La Figura 1 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 acopladas a un fluorocromo verde y que se hicieron reaccionar con suero de ratón después de la inmunización con ADN con la SEQ ID NO: 15 fusionada a un epítipo auxiliar.
- La Figura 2 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de células HEK293 transfectadas con CLD18A2-myc (SEQ ID NO: 3) y células HEK293 no transfectadas con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-c-myc 9E11 (Serotec, CRL MCA2200).
- La Figura 3 muestra un análisis de inmunofluorescencia usando células CHO transfectadas con CLD18A2 y un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).
- Las Figuras 4A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 24H5 y 85A3 a células HEK293 transfectadas transitoriamente con CLD18A2 humana y un marcador fluorescente según se determina mediante citometría de flujo.

- La Figura 4C muestra la unión de los sobrenadantes de hibridoma 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 a células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A2 humana y contratetizadas con yoduro de propidio.
- La Figura 5 muestra la unión de los sobrenadantes de hibridoma 24H5 (A), 9E8 (B), 26B5 (C) y 19B9 (D) a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y CLD18A2 o CLD18A2-Myc o CLD18A2-HA como se analizaron por citometría de flujo.
- Las Figuras 6A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 37H8, 43A11, 45C1 y 163E12 a células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A2 o CLD18A1 humana tal como se determina por citometría de flujo.
- La Figura 7 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal específico de la isoforma CLD18A2 37G11 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones de fijación nativa (A, B) y paraformaldehído (C, D).
- La Figura 8 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal CLB18 26B5 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones de fijación nativa (A, B) y paraformaldehído (C, D).
- La Figura 9. Línea celular RT-PCR. El análisis por RT-PCR con cebadores específicos de la CLD18A2 mostró una expresión clara en 4/5 líneas celulares analizadas.
- La Figura 10 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células DAN-G (subclón F2) y un anticuerpo policlonal anti-CLD18 de conejo (Zymed, CRL 38-8000).
- La Figura 11 muestra un análisis de inmunofluorescencia de células KATO-III (subclón 3B9 4D5) y un anticuerpo policlonal anti-CLD18 de conejo (Zymed, CRL 38-8000).
- La Figura 12A muestra un análisis de inmunofluorescencia de células SNU-16 (subclón G5) con un anticuerpo policlonal de conejo anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000). La Figura 12B muestra un análisis de inmunofluorescencia de células KATO-III con anticuerpos monoclonales de la invención.
- La Figura 13 muestra la expresión superficial de la CLD18 en células KATO-III y NUGC-4 analizadas por tinción de células con anticuerpos monoclonales 61C2 y 163E12 seguida por análisis por citometría de flujo.
- Figura 14. Alineación de proteína de la CLD18A1 humana (NP_057453), CLD18A2 humana (NP_001002026), CLD18A1 ratón (NP_062789) y CLD18A2 de ratón (AAL15636).
- Las Figuras 15A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 38G5, 38H3, 37G11, 45C1, y 163E12, respectivamente, a las células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y, o bien CLD18A1 murina o CLD18A2 murina analizadas por citometría de flujo.
- Figura 16. Análisis inmunohistoquímico con AB p105 policlonal. Las tinciones inmunohistoquímicas en un subconjunto de tejidos normales (estómago, pulmón, médula ósea y próstata) confirman la especificidad del tejido gástrico (A). La expresión también se detectó en carcinomas de estómago (fila superior) y carcinomas de pulmón (B). Solo las células diferenciadas pero no las células madre expresan CLD18A2 (C).
- Figura 17. Análisis inmunohistoquímico con anticuerpo monoclonal AB 39F11D7
- (A) Se detectó expresión de proteína específica en la mucosa estomacal normal, mientras que todos los demás tejidos normales probados fueron negativos.
- (B) Se encontró una expresión fuerte de la CLD18A2 en carcinomas de estómago y pulmón.
- Figura 18. Análisis inmunohistoquímicos con AB 26B5 (A), 175D10 (B), 43A11 (C), 163E12 (D) y 45C1 (E) monoclonales. Todos los anticuerpos muestran una fuerte tinción de tumores de xenoinjerto HEK293-CLD18A2 y muestras de cáncer gástrico, pero no de tumores HEK293-Mock control-transfectados.
- La Figura 19 es un gráfico que compara el porcentaje de células muertas después de la inducción de CDC por 85A3, 28D10, 24H5 o 26D12 contra células HEK293 transfectadas de manera estable con CLD18A2 humana usando citometría de flujo.
- La Figura 20 es un gráfico que compara el porcentaje de lisis celular específica después de la inducción de CDC por 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, o 61C2 contra las células CHO adherentes de manera estable transfectadas con CLD18A2 humana o CLD18A1 humana según determinación por medición de fluorescencia.
- La Figura 21 muestra la inducción dependiente de la concentración de CDC contra células CHO de manera estable transfectadas con CLD18A2 humana por 75B8 (A), 28D10 (B) o 37H8 (C) según determinación por medición de fluorescencia.

- La Figura 22 muestra la lisis de células HEK293-CLD18A2 por 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de MNCs.
- La Figura 23 muestra la lisis de células HEK293-CLD18A1 por 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de MNCs.
- 5 La Figura 24 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano con células HEK293-CLD18A2.
- Las Figuras 25A y B muestran una supervivencia prolongada mediante el tratamiento con anticuerpos de la invención en dos modelos de xenoinjerto de tratamiento temprano con células HEK293-CLD18A2.
- 10 La Figura 26 muestra la prolongación de la supervivencia mediante anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado con células HEK293-CLD18A2.
- La Figura 27A muestra la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano. La Figura 27B muestra la prolongación de la supervivencia mediante anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano. Endógenamente se usaron células DAN-G que expresaban CLD18A2.
- 15 La Figura 28 muestra la expresión de ARNm de la CLD18A2 en tejidos de ratón. Las investigaciones de RT-PCR con cebadores específicos de la CLD18A2 no mostraron expresión significativa en todos los tejidos normales analizados, excepto el estómago. Se analizaron los siguientes tejidos normales: 1: intestino delgado, 2: bazo, 3: piel, 4: estómago, 5: pulmón, 6: páncreas, 7: nódulo linfático, 8: timo, 9: control negativo.
- 20 La Figura 29 muestra la expresión de la CLD18 en estómago normal. El análisis inmunohistoquímico con anticuerpo específico CLD18 del estómago de ratón revela un patrón de expresión conservado. Mientras que el epitelio de la superficie y las criptas más profundas expresan CLD18 en su superficie celular, la región central del cuello es CLD18 negativa.
- La Figura 30 muestra la tinción con hematoxilina y eosina de tejidos estomacales de ratones. Se muestra una visión general (A) y en detalle (B) el estómago de un ratón tratado con 37G11 en comparación con un ratón de control (C y D), que se trató solo con PBS.
- 25 Las Figuras 31A y B muestran la tinción citométrica de flujo de células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A1 y A2 humanas, respectivamente, así como células KATO-III que expresan de forma endógena con anticuerpos de la invención (43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10).
- La Figura 32 muestra CDC en células que expresan CLD18A2 mediadas por anticuerpos quiméricos de la invención.
- 30 La Figura 33 muestra ADCC en células KATO-III mediadas por anticuerpos quiméricos de la invención.
- La Figura 34 muestra una supervivencia prolongada mediante el tratamiento con anticuerpos quiméricos ch-175D10 y ch-163E12 en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano.
- La Figura 35 muestra la prolongación de la supervivencia mediante el tratamiento con anticuerpos quiméricos ch-175D10 y ch-163E12 en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado.
- 35 La Figura 36 muestra experimentos de mapeo de epítomos con anticuerpos ch-175D10 y ch163E12. Se analizó la secuencia de aminoácidos del primer dominio extracelular de la CLD18A2 sin modificaciones (fila superior, sin intercambio Cys-Ser) o con un intercambio de cisteína-serina (fila inferior, intercambio Cys-Ser).
- La Fig. 37 muestra tres modelos diferentes de plegamiento de proteínas para el primer dominio extracelular de la CLD18A2.
- 40 Las Figuras 38A, B y C muestran la unión de ch-175D10, ch-163E12 y ch-125E1 a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y CLD18A1/CLD18A2 murina o CLD18A1/CLD18A2 humana según se analiza por citometría de flujo. Solo las células transfectadas se analizaron y las células muertas se excluyeron del análisis mediante tinción de PI.
- La Fig. 39 muestra un alto nivel de expresión de la membrana plasmática de la CLD18A2 en tumores gástricos primarios y metástasis del cáncer gástrico. La muestra no seleccionada de cáncer gástrico primario y metástasis de cáncer gástrico (tumores de Krukenberg y nódulos linfáticos) se tiñeron con un antisuero de conejo específico de GC182. La inmunohistoquímica, así como la evaluación de la intensidad de la tinción (negativa, débil=1, moderada=2, fuerte=3) y la proporción de células tumorales que muestran una tinción de la membrana plasmática (0-100%) fueron realizadas por patólogos clínicos profesionales. Cada círculo representa un espécimen tumoral independiente. Se observó una intensidad de tinción aumentada estadísticamente significativa en metástasis ($p=0.034$, prueba exacta de Fisher)
- 45 50

Descripción detallada de la invención

Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en CLD18, preferiblemente un epítipo localizado dentro de los dominios extracelulares de la CLD18, en particular el primer dominio extracelular. Los anticuerpos monoclonales aislados abarcados por la presente invención incluyen anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo lambda IgG1, kappa o IgG1. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo lambda IgG3, kappa o IgG3. En aun otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo lambda IgG4, kappa o IgG4. En aun otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2. En aun otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.

En una realización, la presente divulgación se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a células que expresan CLD18, y preferiblemente (i) se unen a células que expresan CLD18A2, y (ii) no se unen a células que no expresan CLD18A2 pero que expresan CLD18A1. Los anticuerpos de la presente enseñanza preferentemente (i) median en la destrucción de células que expresan CLD18A2, y (ii) no median en la destrucción de células que no expresan CLD18A2 pero que expresan CLD18A1.

En otra realización, la enseñanza se refiere a anticuerpos que (i) se unen a células tumorales que expresan CLD18, (ii) no se unen a células que expresan CLD18 de la mucosa estomacal normal, y/o (iii) no se unen a CLD18 que expresa células de tejido pulmonar no canceroso.

Las enseñanzas también incluyen anticuerpos que (i) median en la muerte de células tumorales que expresan CLD18, (ii) no median en la muerte de células que expresan CLD18 de la mucosa estomacal normal, y/o (iii) no intervienen en la muerte de células que expresan CLD18 de tejido pulmonar no canceroso.

En realizaciones particulares, los anticuerpos descritos en el presente documento (i) se unen a un epítipo en CLD18A2 que no está presente en CLD18A1, preferiblemente SEQ ID NO: 21, 22 y 23, (ii) se unen a un epítipo localizado en la CLD18A2-bucle 1, preferiblemente SEQ ID NO: 28, (iii) se unen a un epítipo localizado en la CLD18A2-bucle 2, preferiblemente SEQ ID NO: 30, (iv) se unen a un epítipo localizado en la CLD18A2-bucle D3, preferiblemente SEQ ID NO: 31, (v) se unen a un epítipo, que comprende la CLD18A2-bucle 1 y CLD18A2-bucle D3, (vi) se unen a un epítipo no glicosilado localizado en la CLD18A2-bucle D3, preferiblemente SEQ ID NO: 29, o (vii) se unen a un epítipo presente en CLD18 humana y de ratón (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, respectivamente).

En realizaciones particularmente preferidas, los anticuerpos descritos en este documento se unen a un epítipo en CLD18A2 que no está presente en CLD18A1.

Los anticuerpos descritos en este documento incluyen anticuerpos completamente humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLD18 sometiéndolos a recombinación V-D-J y a cambio de isotipo. Tal animal transgénico también puede ser un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tal como se describe en el documento US 2003/0017534.

La unión de un anticuerpo de la presente enseñanza al antígeno CLD18 puede mediar en la destrucción de células que expresan CLD18 (por ejemplo, una célula tumoral), por ejemplo, por activación del sistema de complemento. La eliminación de células que expresan CLD18 puede producirse por uno o más de los siguientes mecanismos: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de células que expresan CLD18; apoptosis de células que expresan CLD18; fagocitosis de células efectoras de células que expresan CL18; o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos de células efectoras (ADCC) de células que expresan CLD18.

Para que la presente enseñanza se pueda entender más fácilmente, primero se definen ciertos términos. Se establecen definiciones adicionales a lo largo de la descripción detallada.

Definición de términos

El término "CLD18" se refiere a claudina 18 e incluye cualquier variante, incluyendo CLD18A1 y CLD18A2, conformaciones, isoformas y homólogos de especie de la CLD18 que se expresan naturalmente por células o se expresan por células transfectadas con el gen CLD18. Preferiblemente, "CLD18" se refiere a CLD18 humana, en particular CLD18A2 humana y/o CLD18A1 humana, más preferiblemente CLD18A2 humana. La CLD18A2 humana se refiere preferiblemente a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia amino de SEQ ID NO: 2 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o (ii) una proteína que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, e incluye cualquier variante, conformación, isoforma y homólogo de especie de las mismas que se expresan naturalmente por las células o se expresan por las células transfectadas con el gen CLD18A2. La CLD18A1 humana se refiere preferiblemente a (i) un ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica la secuencia amino de SEQ ID NO: 8 tal como un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 7 o (ii) una proteína que comprende secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, e incluye cualquier variante, conformación, isoforma y homólogo de especie de las mismas que se expresan naturalmente por células o se expresan por células transfectadas con el gen CLD18A1.

Las "variantes de CLD 18" también incluyen una forma de la CLD18 que consiste esencialmente en el dominio extracelular o ectodominio de la CLD18. El "dominio extracelular" o "ectodominio" de la CLD18 se refiere a una forma del polipéptido CLD18 que está esencialmente libre de los dominios transmembrana y citoplásmico. Se entenderá que cualquier dominio transmembrana identificado para los polipéptidos CLD18 de la presente invención se identifica de acuerdo con los criterios rutinariamente empleados en la técnica para identificar ese tipo de dominio hidrófobo. Los límites exactos de un dominio transmembrana pueden variar, pero muy probablemente, en no más de aproximadamente 5 aminoácidos en cualquier extremo del dominio como se identifica inicialmente aquí. Opcionalmente, por lo tanto, un dominio extracelular de un polipéptido CLD18 puede contener de aproximadamente 5 o menos aminoácidos en cualquier lado del dominio transmembrana/límite del dominio extracelular como se identifica en los ejemplos o especificación y tales polipéptidos, con o sin el péptido señal asociado, y el ácido nucleico que los codifica, están contemplados por la presente invención.

El término "variante de la CLD18" abarcará (i) variantes de corte y empalme CLD18, (ii) variantes modificadas postraduccion CLD18, que incluyen particularmente variantes con diferente estado de N-glicosilación, (iii) variantes de conformación CLD18, particularmente incluyendo CLD18-conformación-1, CLD18-conformación-2 y CLD18-conformación-3, (iv) CLD18 libre y variantes asociadas homotípicamente/heterotípicamente localizadas en uniones estrechas intercelulares, (v) variantes CLD18 relacionadas con el cáncer y CLD18 no relacionadas con el cáncer.

El término "balsa" se refiere a los microdominios de membrana ricos en esfingolípidos y colesterol localizados en el área de la valva exterior de la membrana plasmática de una célula. La capacidad de ciertas proteínas para asociarse dentro de dichos dominios y su capacidad de formar "agregados" o "agregados focales" puede afectar la función de la proteína. Por ejemplo, la translocación de moléculas de la CLD18 a tales estructuras, después de unirse a los anticuerpos de la presente invención, crea una alta densidad de complejos CLD18 antígeno-anticuerpo en las membranas plasmáticas. Tal alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo CLD18 puede permitir la activación eficiente del sistema del complemento durante la CDC.

Los términos "conformación" y "topología" describen cómo se posiciona una molécula de membrana integral en la membrana de la superficie celular y, en particular, cuáles de sus regiones son extracelulares y, por lo tanto, elegibles para anticuerpos. La CLD18, por ejemplo, puede existir en tres conformaciones diferentes, que muy probablemente dependan de si son frecuentes como homómeros o heterómeros y si están integradas en estructuras de unión estrechas supramoleculares o "libres". Estos diferentes estados dan como resultado diferentes epítopos elegibles para anticuerpos.

De acuerdo con la invención, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, que incluye cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas aquí. Cualquier referencia en este documento a cáncer o formas particulares de cáncer también incluye metástasis de cáncer de los mismos.

Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o tejido que crece por una proliferación celular rápida e incontrolada y continúa creciendo después de que cesan los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una falta parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigna o maligna.

Por "metástasis" se entiende la diseminación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de células malignas del tumor primario, invasión de la matriz extracelular, penetración de las membranas basales endoteliales para ingresar en la cavidad corporal y los vasos, y luego, después de ser transportado por la sangre, infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la eliminación del tumor primario porque las células o los componentes del tumor pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" según la invención se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y el sistema de nódulos linfáticos regionales. En una realización, el término "metástasis" según la invención se refiere a metástasis de nódulos linfáticos. Una forma particular de metástasis que se puede tratar usando los anticuerpos de la invención es la metástasis que se origina a partir del cáncer gástrico como sitio primario. En realizaciones preferidas, tales metástasis de cáncer gástrico son tumores de Krukenberg, metástasis peritoneales y/o metástasis de nódulos linfáticos.

El tumor de Krukenberg es un tumor metastásico poco común del ovario que representa del 1% al 2% de todos los tumores de ovario. El pronóstico del tumor de Krukenberg es aún muy pobre y no existe un tratamiento establecido para los tumores de Krukenberg. El tumor de Krukenberg es un adenocarcinoma de anillo de sello metastásico del ovario. El estómago es el sitio primario en la mayoría de los casos de tumores Krukenberg (70%). Los carcinomas de colon, apéndice y mama (principalmente carcinoma lobular invasivo) son los siguientes sitios primarios más comunes. Se han notificado casos poco frecuentes de tumor de Krukenberg originados en carcinomas de la vesícula biliar, el tracto biliar, el páncreas, el intestino delgado, la ampolla de Vater, el cuello uterino y la vejiga urinaria/uraco. El intervalo entre el diagnóstico de un carcinoma primario y el posterior descubrimiento de afectación ovárica suele ser de 6 meses o menos, pero se han informado períodos más largos. En muchos casos, el tumor primario es muy pequeño y puede escapar a la detección. Se puede obtener un historial de un carcinoma previo del estómago u otro órgano en solo 20% a 30% de los casos.

5 El tumor de Krukenberg es un ejemplo de la diseminación selectiva de cánceres, más comúnmente en el eje estómago-ovario. Este eje de diseminación tumoral ha atraído históricamente la atención de muchos patólogos, especialmente cuando se descubrió que las neoplasias gástricas se metastatizan selectivamente a los ovarios sin la participación de otros tejidos. La ruta de la metástasis del carcinoma gástrico a los ovarios ha sido un misterio durante mucho tiempo, pero ahora es evidente que la diseminación linfática retrógrada es la ruta más probable de metástasis.

10 Las mujeres con tumores Krukenberg tienden a ser inusualmente jóvenes para los pacientes con carcinoma metastásico, ya que normalmente se encuentran en la quinta década de sus vidas, con una edad promedio de 45 años. Esta edad joven de distribución puede estar relacionada en parte con el aumento de la frecuencia de carcinomas de células de anillo de sello gástrico en mujeres jóvenes. Los síntomas de presentación comunes generalmente se relacionan con la afectación ovárica, la más común de las cuales es el dolor abdominal y la distensión (principalmente debido a las masas ováricas usualmente bilaterales y a menudo grandes). Los pacientes restantes tienen síntomas gastrointestinales inespecíficos o son asintomáticos. Además, el tumor de Krukenberg está asociado con la virilización resultante de la producción de hormonas por el estroma ovárico. La ascitis está presente en el 50% de los casos y generalmente revela células malignas.

15 Los tumores de Krukenberg son bilaterales en más del 80% de los casos informados. Los ovarios suelen estar agrandados asimétricamente, con un contorno con protuberancias. Las superficies seccionadas son amarillas o blancas; generalmente son sólidos, aunque ocasionalmente son quísticos. Es importante destacar que la superficie capsular de los ovarios con tumores de Krukenberg es generalmente lisa y sin adherencias ni depósitos peritoneales. Es de destacar que otros tumores metastásicos del ovario tienden a asociarse con implantes superficiales. Esto puede explicar por qué la morfología macroscópica del tumor de Krukenberg puede aparecer engañosamente como un tumor ovárico primario. Sin embargo, el bilateralismo en el tumor de Krukenberg es consistente con su naturaleza metastásica.

20 Los pacientes con tumores de Krukenberg tienen una tasa de mortalidad global que es significativamente alta. La mayoría de los pacientes mueren dentro de los 2 años (mediana de supervivencia, 14 meses). Varios estudios muestran que el pronóstico es pobre cuando se identifica el tumor primario después de que se descubre la metástasis en el ovario y el pronóstico empeora si el tumor primario permanece encubierto.

25 No se ha establecido claramente en la literatura ninguna estrategia de tratamiento óptima para tumores Krukenberg. No se ha abordado adecuadamente si debe realizarse una resección quirúrgica. La quimioterapia o la radioterapia no tienen un efecto significativo sobre el pronóstico de los pacientes con tumores de Krukenberg.

30 El término "tratamiento de una enfermedad" incluye curación, acortamiento de la duración, mejora, prevención, ralentización o inhibición de la progresión o empeoramiento, o prevención o retraso del inicio de una enfermedad o los síntomas de la misma.

35 Según la invención, una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente invención, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, que incluye fluidos corporales, y/o una muestra celular y puede obtenerse de la manera convencional tal como como por medio de una biopsia de tejido, incluida una biopsia con sacabocados, y tomando sangre, aspirado bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. De acuerdo con la invención, el término "muestra biológica" también incluye fracciones de muestras biológicas.

40 El término "anticuerpo" se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una porción de unión a antígeno del mismo. El término "anticuerpo" también incluye todas las formas recombinantes de anticuerpos, en particular de los anticuerpos descritos en el presente documento, por ejemplo, anticuerpos expresados en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquier fragmento y derivado de anticuerpo que se une a antígeno como se describe a continuación. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena liviana está compuesta por una región variable de cadena liviana (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena liviana. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL está compuesto por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del huésped, que incluyen diversas células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

45 El término "anticuerpo humanizado" se refiere a una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno que se deriva sustancialmente de una inmunoglobulina de una especie no humana, donde la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula se basa en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados en dominios constantes o solo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) injertadas en regiones marco apropiadas en los dominios variables. Los sitios de unión a antígeno pueden ser de tipo salvaje o modificados por una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo modificado para parecerse más a las inmunoglobulinas humanas. Algunas formas de anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene

las seis CDR del anticuerpo de ratón). Otras formas tienen una o más CDR que están alteradas con respecto al anticuerpo original.

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesadas y ligeras es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o pertenecientes a una clase particular, mientras que el resto del segmento de la cadena es homólogo a las secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de ambas cadenas ligera y pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivados de otra. Una clara ventaja de tales formas quimerizadas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas que usan células B fácilmente disponibles o hibridomas de organismos hospedadores no humanos en combinación con regiones constantes derivadas de, por ejemplo, preparaciones de células humanas. Si bien la región variable tiene la ventaja de facilitar la preparación y la fuente no afecta a la especificidad, la región constante es humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no está limitada a este ejemplo particular.

El término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "parte de unión"), como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) fragmentos Fab, fragmentos monovalentes que consisten en los dominios VL, VH, CL y CH; (ii) fragmentos F(ab')₂, fragmentos bivalentes que comprenden dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) fragmentos Fd que consisten en los dominios VH y CH; (iv) fragmentos Fv que consisten en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) fragmentos dAb (Ward et al., (1989) *Nature* 341: 544-546), que consisten en un dominio VH; (vi) regiones determinantes de complementariedad aisladas (CDR), y (vii) combinaciones de dos o más CDR aisladas que pueden unirse opcionalmente mediante un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, usando métodos recombinantes, mediante un enlazador sintético que les permite formarse como una sola cadena de proteína en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena única (scFv); véase, por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242: 423-426, y Huston y otros (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 5879-5883). Dichos anticuerpos de cadena sencilla también pretenden incluirse dentro del término "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo. Un ejemplo adicional es proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión que comprenden (i) un polipéptido de dominio de unión que está fusionado a un polipéptido de región bisagra de inmunoglobulina, (ii) una región constante de CH₂ de cadena pesada de inmunoglobulina fusionada a la región de bisagra y (iii) una inmunoglobulina región constante de CH₃ de cadena pesada fusionada a la región constante de CH₂. El polipéptido del dominio de unión puede ser una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena liviana. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión se describen adicionalmente en los documentos US 2003/0118592 y US 2003/0133939. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos.

El término "epítipo" significa un determinante de proteína capaz de unirse a un anticuerpo, en donde el término "unión" en el presente documento se refiere preferiblemente a una unión específica. Los epítipos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y, por lo general, tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Los epítipos conformacionales y no conformacionales se distinguen porque la unión al primero, pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturizantes.

El término "epítipo discontinuo", como se usa en el presente documento, significa un epítipo conformacional en un antígeno de proteína que se forma a partir de al menos dos regiones separadas en la secuencia primaria de la proteína.

El término "molécula biespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, un complejo de proteína, péptido o proteína o péptido, que tiene dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula puede unirse o interactuar con (a) un antígeno de superficie celular, y (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora. El término "molécula multiespecífica" o "molécula heteroespecífica" pretende incluir cualquier agente, por ejemplo, un complejo de proteína, péptido o proteína o péptido, que tiene más de dos especificidades de unión diferentes. Por ejemplo, la molécula se puede unir a, o interactuar con, (a) un antígeno de superficie celular, (b) un receptor de Fc en la superficie de una célula efectora, y (c) al menos otro componente. Por consiguiente, la invención incluye, pero no se limita a, moléculas biespecíficas, trispecíficas, tetraspecíficas y otras multiespecíficas que se dirigen a CLD18, y a otras dianas, tales como receptores de Fc sobre células efectoras. El término "anticuerpos biespecíficos" también incluye diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero utilizando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, lo que obliga a los dominios a emparejarse con dominios de otra cadena y la creación de dos sitios de unión a antígeno (véase, por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) *Structure* 2: 1121-1123).

La invención también incluye derivados de los anticuerpos descritos en este documento. El término "derivados de anticuerpos" se refiere a cualquier forma modificada de un anticuerpo, por ejemplo, un conjugado del anticuerpo y otro agente o anticuerpo. Tal como se usa en el presente documento, un anticuerpo se deriva de una secuencia de línea germinal particular si el anticuerpo se obtiene de un sistema inmunizando un animal o explorando una biblioteca de genes de inmunoglobulina, y en donde el anticuerpo seleccionado es al menos 90%, más preferiblemente al menos 95%, aún más preferiblemente al menos 96%, 97%, 98%, o 99% idénticos en secuencia de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal. Típicamente, un anticuerpo derivado de una secuencia particular de la línea germinal mostrará no más de 10 diferencias de aminoácidos, más preferiblemente, no más de 5, o incluso más preferiblemente, no más de 4, 3, 2 o 1 diferencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de inmunoglobulina de línea germinal.

Como se usa en el presente documento, el término "heteroanticuerpos" se refiere a dos o más anticuerpos, derivados de los mismos, o regiones de unión a antígenos unidos entre sí, al menos dos de los cuales tienen especificidades diferentes. Estas diferentes especificidades incluyen una especificidad de unión por un receptor de Fc en una célula efectora, y una especificidad de unión por un antígeno o epítipo en una célula diana, por ejemplo, una célula tumoral.

Los anticuerpos descritos en este documento pueden ser anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal muestra una única especificidad de unión y afinidad por un epítipo particular. En una realización, los anticuerpos monoclonales se producen mediante un hibridoma que incluye una célula B obtenida de un animal no humano, por ejemplo, un ratón, fusionado a una célula inmortalizada.

El término "anticuerpo recombinante", como se usa en el presente documento, incluye todos los anticuerpos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como (a) anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico o transcromosómico con respecto a los genes de inmunoglobulina o un hibridoma preparado a partir de los mismos, (b) anticuerpos aislados de una célula huésped transformada para expresar el anticuerpo, por ejemplo, de un transfectoma, (c) anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos combinatoria y (d) anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias del gen de inmunoglobulina a otras secuencias de ADN.

El término "transfectoma", como se usa en el presente documento, incluye células huéspedes eucariotas recombinantes que expresan un anticuerpo, tales como células CHO, células NS/O, células HEK293, células HEK293T, células vegetales u hongos, que incluyen células de levadura.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce dicho anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácidos nucleicos codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no está constituido por el organismo transgénico, y que generalmente deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas livianas y pesadas de diferentes orígenes de organismos. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena liviana murina es un anticuerpo heterohíbrido.

Los anticuerpos descritos en el presente documento están preferiblemente aislados. Un "anticuerpo aislado" como se usa en este documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a CLD18 está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de la CLD18). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a un epítipo, isoforma o variante de la CLD18 humana puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos relacionados, por ejemplo, de otras especies (por ejemplo, homólogos de especies de la CLD18). Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. En una realización de la invención, una combinación de anticuerpos monoclonales "aislados" se refiere a anticuerpos que tienen especificidades diferentes y se combinan en una composición bien definida.

De acuerdo con la invención, el término "unión" se refiere preferiblemente a "unión específica". Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a una KD de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos, y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a una KD que es al menos dos órdenes de magnitud menor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término "KD" (M), tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción particular anticuerpo-antígeno.

Como se usa en el presente documento, "isotipo" se refiere a la clase de anticuerpo (por ejemplo, IgM o IgG1) que está codificada por genes de la región constante de la cadena pesada.

- 5 Como se usa en el presente documento, "conmutación de isotipo" se refiere al fenómeno por el cual la clase, o isotipo, de un anticuerpo cambia de una clase de Ig a una de las otras clases de Ig.

10 El término "de origen natural" tal como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptido o polinucleótido que está presente en un organismo (incluidos virus) que puede aislarse de una fuente en la naturaleza y que no ha sido modificada intencionalmente por el hombre en el laboratorio se produce naturalmente.

15 El término "reorganizado" como se usa en este documento se refiere a una configuración de un locus de inmunoglobulina de cadena pesada o cadena liviana en donde un segmento V está inmediatamente adyacente a un segmento D-J o J en una conformación que codifica esencialmente un dominio VH o VL completo, respectivamente. Un locus del gen de inmunoglobulina (anticuerpo) reorganizado se puede identificar por comparación con el ADN de la línea germinal; un locus redistribuido tendrá al menos un elemento de homología de heptámero/nonámero recombinado.

El término "configuración no reordenada" o "línea germinal" como se usa en el presente documento en referencia a un segmento V se refiere a la configuración en la que el segmento V no se recombina para estar inmediatamente adyacente a un segmento D o J.

- 20 El término "molécula de ácido nucleico", como se usa en el presente documento, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble cadena.

25 Los ácidos nucleicos descritos según la presente enseñanza se han aislado preferiblemente. El término "ácido nucleico aislado" significa según la invención que el ácido nucleico fue (i) amplificado *in vitro*, por ejemplo, mediante reacción en cadena de polimerasa (PCR), (ii) producido recombinantemente por clonación, (iii) purificado, por ejemplo, por fraccionamiento y fraccionamiento electroforético en gel, o (iv) sintetizado, por ejemplo, por síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para la manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

30 Los ácidos nucleicos, según la presente enseñanza, pueden estar presentes solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, que pueden ser homólogos o heterólogos. En realizaciones preferidas, un ácido nucleico está unido funcionalmente a secuencias de control de la expresión que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. El término "homólogo" significa que un ácido nucleico también está unido funcionalmente a la secuencia de control de la expresión de forma natural y el término "heterólogo" significa que un ácido nucleico no está funcionalmente unido a la secuencia de control de la expresión de forma natural.

35 Un ácido nucleico, tal como un ácido nucleico que expresa ARN y/o proteína o péptido, y una secuencia de control de la expresión están "funcionalmente" unidos entre sí, si están unidos covalentemente entre sí de tal manera que la expresión o la transcripción de dicho ácido nucleico está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia de control de la expresión. Si el ácido nucleico debe traducirse en una proteína funcional, entonces, con una secuencia de control de expresión funcionalmente unida a una secuencia codificante, la inducción de dicha secuencia de control de expresión da como resultado la transcripción de dicho ácido nucleico, sin provocar un cambio de marco en la secuencia codificante o dicha secuencia de codificación no puede traducirse en la proteína o péptido deseado.

45 El término "secuencia de control de la expresión" comprende, según la invención, promotores, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares de la invención, se pueden regular las secuencias de control de la expresión. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar como una función de la especie o tipo de célula, pero generalmente comprende secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están involucradas en el inicio de la transcripción y traducción, respectivamente, tales como caja TATA, secuencia de protección, secuencia CAAT, y similares. Más específicamente, las secuencias de control de expresión 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba.

55 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está situada corriente arriba (5') en la secuencia de ácido nucleico que se expresa y controla la expresión de la secuencia proporcionando un reconocimiento y sitio de unión para la ARN polimerasa. La "región promotora" puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para otros factores que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procarionota o eucariota. Además, un promotor puede ser "inducible" y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser

"constitutivo" si la transcripción no está controlada por un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o solo se expresa en una pequeña medida si está ausente un agente inductor. En presencia del agente inductor, el gen se enciende o se aumenta el nivel de transcripción. Esto está mediado, en general, por la unión de un factor de transcripción específico.

5 Los promotores que se prefieren de acuerdo con la invención incluyen promotores para SP6, T3 y polimerasa T7, promotor de ARN U6 humano, promotor de CMV y promotores híbridos artificiales de los mismos (por ejemplo, CMV) donde una parte o partes están fusionadas a una parte o partes de promotores de genes de otras proteínas celulares tales como, por ejemplo, GAPDH humano (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) e incluyendo o no intrones adicionales.

10 De acuerdo con la presente enseñanza, el término "expresión" se usa en su significado más general y comprende la producción de ARN o de ARN y proteína/péptido. También comprende la expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede llevarse a cabo de forma transitoria o estable.

15 En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico está presente en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa aquí en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Los vectores de este tipo preferiblemente se replican y/o expresan en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término "plásmido", como se usa en el presente documento, se refiere en general a una construcción de material genético extracromosómico, habitualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

20 Como vector para la expresión de un anticuerpo, puede usarse ya sea un vector en donde la cadena pesada y la cadena liviana del anticuerpo están presentes en diferentes vectores o ya sea un vector en donde la cadena pesada y la cadena liviana están presentes en el mismo vector.

25 Las enseñanzas dadas aquí con respecto a secuencias de ácidos nucleicos y de aminoácidos específicas, por ejemplo las que se muestran en el listado de secuencias, deben interpretarse de manera que también se relacionen con modificaciones de dichas secuencias específicas que dan como resultado secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicas y secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o sostener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo, conserva la unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferiblemente funciones de dicho anticuerpo como se describe en el presente documento, por ejemplo lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.

35 Los expertos en la técnica apreciarán que, en particular, las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLD18. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones de anticuerpos especificadas en este documento. Por "altamente homóloga" se contempla que pueden hacerse de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tal como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden modificarse de modo que muestren una homología sustancial con las regiones de los anticuerpos descritos específicamente en este documento.

40 Debe entenderse que los ácidos nucleicos específicos descritos en el presente documento también incluyen ácidos nucleicos modificados con el fin de optimizar el uso de codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias en el uso de codones entre organismos pueden conducir a una variedad de problemas relacionados con la expresión de genes heterólogos. La optimización de codones cambiando uno o más nucleótidos de la secuencia original puede dar como resultado una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la optimización de la eficacia de traducción, en un hospedador homólogo o heterólogo en donde debe expresarse dicho ácido nucleico. Por ejemplo, si los ácidos nucleicos derivados de las regiones humanas y constantes de codificación y/o las regiones estructurales de los anticuerpos se van a usar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados, se puede preferir modificar dichos ácidos nucleicos para optimizar el uso de codones, en particular si dichos ácidos nucleicos, opcionalmente fusionados a ácidos nucleicos heterólogos tales como ácidos nucleicos derivados de otros organismos como se describe aquí, deben expresarse en células de un organismo diferente del humano, como el ratón o el hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadena liviana y pesada humanas tales como las según las SEQ ID NO: 40 y 45, respectivamente, pueden modificarse para incluir una o más, preferiblemente, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y preferiblemente hasta 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 o 100 o más reemplazos de nucleótidos que dan como resultado un uso optimizado de codones pero que no da como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos. Dichas sustituciones de nucleótidos preferiblemente se refieren a reemplazos de nucleótidos en las SEQ ID NOs: 40 y 45, respectivamente, seleccionados de los reemplazos mostrados en la siguiente alineación de las SEQ ID NOs: 40 y 45, respectivamente, con sus contrapartes modificadas y que no dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada o se refieren a reemplazos correspondientes en posiciones correspondientes en otras

ES 2 675 375 T3

5 secuencias de ácidos nucleicos que codifican regiones constantes de cadenas livianas y pesadas humanas, respectivamente. Preferiblemente, todas las sustituciones mostradas en las siguientes alineaciones de SEQ ID NOs: 40 y 45, respectivamente, con sus contrapartes modificadas que no dan como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada, se efectúan en secuencias de ácido nucleico que codifican regiones constantes de cadena liviana y pesada humana, respectivamente.

Alineación de SEQ ID NO: 40 y SEQ ID NO: 147:

```

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CGTACGGTGGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

GGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120

TGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC 180
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
TGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180

AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG 240

AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG 300
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300

AGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG 324
|||||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCTTCAACAGGGGCGAGTGCTAG 324

```

Alineación de SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 149:

ES 2 675 375 T3

GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC 60
||||| | | ||||||||| | | | | ||||||||| | | ||||||||| | |
GGCCCAAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCGCGCGGCACAGCCGCC 60

CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC 120
||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
CTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGA 120

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC 180
||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC 180

CTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240
| | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
CTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAAC 240

GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCTTGTGAC 300
||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCAAAGAGCTGCGAC 300

AAAACCTCACACATGCCACCCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC 360
| | | | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | |
AAGACCCACACCTGCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCC 360

CTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC 420
| | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | | |||||| | |
CTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGC 420

GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480
||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
GTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGC 480

GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 540
||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | | ||||||||| | |
GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGG 540

hibridación a 65°C en regulador de hibridación (3.5 x SSC, 0.02% Ficoll, 0.02% polivinilpirrolidona, 0.02% albúmina de suero bovino, NaH₂PO₄ 2.5 mM (pH 7), SDS al 0.5%, EDTA 2 mM). El SSC es cloruro de sodio 0.15 M/citrato de sodio 0.15 M, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego en 0.1-0.5 x SSC/0.1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C.

- 5 Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente identidad entre una secuencia de aminoácidos específica descrita aquí y una secuencia de aminoácidos que está modificada con respecto a o que es una variante de dicha secuencia de aminoácidos específica tal como entre secuencias de aminoácidos que muestran una homología sustancial será al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90% o lo más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Con respecto a las variantes del polipéptido CLD18, el grado de similitud o identidad se da preferiblemente para una región de al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, al menos aproximadamente 200, al menos aproximadamente 220, al menos aproximadamente 240, al menos aproximadamente 250 o 260 aminoácidos. En realizaciones preferidas, el grado de similitud o identidad se da para toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de referencia tal como las secuencias de aminoácidos dadas en la lista de secuencias.

Todas las secuencias modificadas o variantes de secuencias descritas anteriormente están dentro del alcance de la presente invención.

- 20 La "similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o representan sustituciones de aminoácidos conservativas. La "identidad de secuencia" entre dos secuencias de polipéptido o ácido nucleico indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

- 25 El "porcentaje de identidad" se obtiene después de la mejor alineación, siendo este porcentaje puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen al azar y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos o aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente comparando estas secuencias después de haberlas alineado de manera óptima, llevándose a cabo dicha comparación por segmento o por "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. La alineación óptima de las secuencias para comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, *Ads App. Math.* 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Neddleman y Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, WI).

El porcentaje de identidad se calcula determinando el número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que están siendo comparadas, dividiendo este número por el número de posiciones comparadas y multiplicando el resultado obtenido por 100 de forma que se obtenga el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

- 35 Pueden hacerse "sustituciones conservativas", por ejemplo, sobre la base de la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos implicados. Por ejemplo: (a) los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina; (b) los aminoácidos neutros polares incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina; (c) los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y (d) aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las sustituciones generalmente se pueden hacer dentro de los grupos (a)-(d). Además, la glicina y la prolina se pueden sustituir entre sí en función de su capacidad para alterar hélices α . Algunas sustituciones preferidas pueden hacerse entre los siguientes grupos: (i) S y T; (ii) P y G; y (iii) A, V, L e I. Dado el código genético conocido, y las técnicas de ADN recombinante y sintético, el experto en la materia puede construir fácilmente ADN que codifique las variantes de aminoácidos conservativas.

- 45 La presente enseñanza abarca anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc con el fin de cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Dichas alteraciones pueden dar como resultado una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de Fc γ R y ADCC. Las sustituciones pueden realizarse, por ejemplo, en uno o más de los residuos de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, provocando de ese modo una alteración en una función efectora mientras se retiene la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, véase US 5,624,821 y US 5,648,260.

- 55 La vida media *in vivo* de los anticuerpos se puede mejorar modificando el epítipo del receptor de rescate del dominio constante de Ig o un dominio constante de tipo Ig de modo que la molécula no comprenda un dominio CH2 intacto o una región de Fc de Ig intacta, cf. US 6,121,022 y US 6,194,551. La vida media *in vivo* puede aumentarse adicionalmente haciendo mutaciones en la región Fc, por ejemplo, sustituyendo treonina por leucina en la posición 252, sustituyendo treonina por serina en la posición 254, o sustituyendo treonina por fenilalanina en la posición 256, cf. US 6,277,375.

Además, el patrón de glicosilación de anticuerpos se puede modificar para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden expresar en un transfectoma que no agrega la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de mejorar la afinidad de la región Fc por

receptores Fc que, a su vez, dará como resultado en una ADCC incrementada de los anticuerpos en presencia de células NK, cf. Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733. Además, se puede realizar una modificación de la galactosilación para modificar CDC.

5 Alternativamente, en otra realización, las mutaciones se pueden introducir aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia de codificación del anticuerpo anti-CLD18, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CLD18 modificados resultantes se pueden cribar para la actividad de unión.

10 El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que dichos términos están destinados a referirse no solo a la célula objeto particular sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones sucesivas debido a la mutación o influencias ambientales, tal progenie puede, de hecho, no ser idéntica a la célula parental, pero todavía están incluidas dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en este documento. Las células huéspedes recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/O y células linfocíticas.

15 Como se usa en el presente documento, el término "sujeto" incluye cualquier animal humano o no humano. El término "animal no humano" incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos y no mamíferos, tales como primates no humanos, ovejas, perros, vacas, pollos, anfibios, reptiles, etc.

20 El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén de cadena liviana humana y un transgén de cadena pesada humana o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-CLD18 humanos cuando se inmuniza con antígeno CLD18 y/o células que expresan CLD18. El transgén de la cadena pesada humana puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso de los ratones transgénicos, por ejemplo, los ratones HuMAb, como los ratones HCo7 o HCo2, o el transgén de la cadena pesada humana puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso para ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Dichos ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos para CLD18 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y cambio de isotipo.

30 "Reducir" o "inhibir" como se usa en este documento significa la capacidad de causar una disminución global, preferiblemente de 5% o más, 10% o más, 20% o más, más preferiblemente de 50% o más, y lo más preferiblemente de 75% o más, en el nivel, por ejemplo en el nivel de proliferación de las células.

Mecanismos de acción de mAb

Aunque lo que sigue proporciona consideraciones con respecto al mecanismo que subyace a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención, no se debe considerar como limitante de ningún modo para la invención.

35 Los anticuerpos descritos en este documento preferiblemente interactúan con componentes del sistema inmune, preferiblemente a través de ADCC o CDC. Los anticuerpos de la invención también pueden usarse para direccionar cargas (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para destruir directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunes antitumorales, que pueden haber sido comprometidos debido a los efectos secundarios citotóxicos de un agente quimioterapéutico sobre los linfocitos T. Sin embargo, los anticuerpos de la invención también pueden ejercer un efecto simplemente uniéndose a CLD18 en la superficie celular bloqueando, por lo tanto, por ejemplo la proliferación de las células.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

45 La ADCC describe la capacidad de las células efectoras para matar células como se describe en el presente documento, en particular linfocitos, lo que preferiblemente requiere que la célula diana esté marcada por un anticuerpo.

50 La ADCC preferiblemente se produce cuando los anticuerpos se unen a antígenos en células tumorales y los dominios Fc del anticuerpo se aplican a los receptores Fc (FcR) en la superficie de las células efectoras inmunes. Se han identificado varias familias de receptores de Fc, y las poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores de Fc definidos. La ADCC se puede ver como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de destrucción tumoral inmediata que conduce a la presentación del antígeno y a la inducción de respuestas de células T dirigidas por el tumor. Preferiblemente, la inducción in vivo de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas al tumor y respuestas de anticuerpos derivadas del huésped.

Citotoxicidad dependiente del complemento

55 La CDC es otro método de destrucción celular que puede ser dirigido por anticuerpos. La IgM es el isotipo más efectivo para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 también son muy efectivas para direccionar CDC a través de la vía clásica de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-

anticuerpo da como resultado el descubrimiento de múltiples sitios de unión a C1q en las proximidades de los dominios C_H2 de moléculas de anticuerpo participantes tales como moléculas IgG (C1q es uno de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente estos sitios de unión C1q no codificados convierten la interacción C1q-IgG de baja afinidad a una de alta avidéz, que desencadena una cascada de eventos que involucran una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan el paso libre de agua y solutos hacia y desde la célula.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la invención se pueden producir mediante una variedad de técnicas, que incluyen metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica de hibridación de células somáticas estándar de Kohler y Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, en principio, se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos B o técnicas de presentación en fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

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

Otros sistemas animales preferidos para preparar hibridomas que secretan anticuerpos monoclonales son los sistemas de rata y de conejo (por ejemplo, descritos en Spieker-Polet et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 9348 (1995), véase también Rossi et al., Am. J. Clin. Pathol. 124: 295 (2005)).

En aun otra realización preferida, los anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLD18 pueden generarse usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente aquí como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos se puede realizar como se describe en detalle para CD20 en el documento WO2004035607.

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

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos para CLD18, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con portadores derivados de la secuencia CLD18, una preparación enriquecida de antígeno CLD18 expresada de manera recombinante o fragmentos de los mismos y/o células que expresan CLD18, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden inmunizarse con ADN que codifica CLD18 humana de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) o fragmentos de los mismos, en particular los de las SEQ ID Nos: 15, 17 y 19. En el caso de que las inmunizaciones que utilicen una preparación purificada o enriquecida del antígeno CLD18 no den como resultado anticuerpos, los ratones también pueden inmunizarse con células que expresan CLD18, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La respuesta inmune puede controlarse durante el transcurso del protocolo de inmunización con muestras de plasma y suero que se obtienen de la vena de la cola o por hemorragias retroorbitales. Se pueden usar ratones con título suficiente de inmunoglobulina anti-CLD18 para las fusiones. Los ratones se pueden reforzar intraperitonealmente o por vía intravenosa con células que expresan CLD18 3 días antes del sacrificio y la extracción del bazo para aumentar la tasa de hibridomas que secretan anticuerpos específicos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales

Para generar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales para CLD18, se pueden aislar esplenocitos y células de nódulos linfáticos de ratones inmunizados y fusionarlos a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes se pueden cribar para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales se pueden cribar mediante ELISA para hibridomas que secretan anticuerpos. Mediante análisis de inmunofluorescencia y FACS utilizando células que expresan CLD18, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para CLD18. Los hibridomas que secretan anticuerpos se pueden volver a resembrar, analizar de nuevo, y si todavía son positivos para anti-CLD18, los anticuerpos monoclonales se pueden subclonar mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden cultivarse *in vitro* para generar anticuerpos en un medio de cultivo de tejidos para su caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la invención también pueden producirse en un transfectoma de célula huésped usando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección génica como se conocen bien en la técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229: 1202).

5 Por ejemplo, en una realización, los genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse en un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el usado por el sistema de expresión del gen GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonados se puede introducir en células huéspedes eucariotas tales como células CHO, células NS/O, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células fúngicas o de levadura. El método usado para introducir estos genes puede ser un método descrito en la técnica tal como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpos en las células huésped, se pueden identificar y seleccionar las células que expresan el anticuerpo. Estas células representan los transfectomas que luego pueden amplificarse para su nivel de expresión y ampliarse para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes se pueden aislar y purificar a partir de estos sobrenadantes y/o células de cultivo.

15 Alternativamente, los genes del anticuerpo clonado se pueden expresar en otros sistemas de expresión, que incluyen células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo *E. coli*. Adicionalmente, los anticuerpos pueden producirse en animales transgénicos no humanos, tales como en leche de ovejas y conejos o en huevos de gallinas, o en plantas transgénicas; véase por ejemplo Verma, R., et al. (1998) *J. Immunol. Meth.* 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) *J. Immunol. Meth.* 231: 147-157; and Fischer, R., et al. (1999) *Biol. Chem.* 380: 825-839.

20 Uso de secuencias de anticuerpos parciales para expresar anticuerpos intactos (es decir, humanización y quimerización).

a) Quimerización

Los anticuerpos monoclonales murinos pueden usarse como anticuerpos terapéuticos en humanos cuando se marcan con toxinas o isótopos radiactivos. Los anticuerpos murinos no marcados son altamente inmunogénicos en el hombre cuando se aplican repetidamente, lo que conduce a la reducción del efecto terapéutico. La inmunogenicidad principal está mediada por las regiones constantes de la cadena pesada. La inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en el hombre puede reducirse o evitarse completamente si los anticuerpos respectivos se quimerizan o se humanizan. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos, cuyas diferentes partes se derivan de diferentes especies animales, tales como las que tienen una región variable derivada de un anticuerpo murino y una región constante de inmunoglobulina humana. La quimerización de anticuerpos se logra uniendo las regiones variables de la cadena pesada y ligera del anticuerpo murino con la región constante de cadena pesada y ligera humana (por ejemplo, como describen Kraus et al., en *Methods in Molecular Biology series, Recombinant antibodies for cancer therapy* ISBN-0-89603-918-8). En una realización preferida, se generan anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de la cadena liviana kappa humana con la región variable de la cadena liviana murina. En una realización también preferida, se pueden generar anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de la cadena lambda-liviana humana con la región variable de la cadena liviana murina. En una realización también preferida, se pueden generar anticuerpos quiméricos uniendo la región constante de la cadena lambda-liviana humana con la región variable de la cadena liviana murina. Las regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG1, IgG3 e IgG4. Otras regiones constantes de cadena pesada preferidas para la generación de anticuerpos quiméricos son IgG2, IgA, IgD e IgM.

b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de la complementariedad de las cadenas pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales específicos construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado en secuencias marco de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327; Jones, por ejemplo, et al (1986) *Nature* 321: 522-525; y Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033). Dichas secuencias marco se pueden obtener a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal diferirán de las secuencias del gen del anticuerpo maduro porque no incluirán genes variables completamente ensamblados, que están formados por la unión V (D) J durante la maduración de las células B. Las secuencias génicas de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en individuos de manera uniforme en toda la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región 1 marco y en la porción carboxi terminal de la región estructural 4 marco. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener la secuencia de ADN completa de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tenga propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Las secuencias parciales de cadena pesada y ligera que

abarcen las regiones CDR son típicamente suficientes para este propósito. La secuencia parcial se usa para determinar qué parte de la línea germinal y segmentos génicos de unión contribuyeron a los genes variables de anticuerpos recombinados. La secuencia de la línea germinal se usa para completar las partes faltantes de las regiones variables. Las secuencias líder de la cadena pesada y ligera se escinden durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de ADNc clonadas se pueden combinar con oligonucleótidos sintéticos mediante ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable completa puede sintetizarse como un conjunto de oligonucleótidos cortos que se solapan y combinarse por amplificación por PCR para crear un clon de región variable completamente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

5
10
15

Las secuencias de nucleótidos de transcritos de cadena pesada y ligera de hibridomas se usan para diseñar un conjunto de oligonucleótidos sintéticos superpuestos para crear secuencias V sintéticas con capacidades de codificación de aminoácidos, idénticas a las secuencias naturales. Las secuencias sintéticas de cadena pesada y kappa pueden diferir de las secuencias naturales de tres maneras: cadenas de bases de nucleótidos repetidas se interrumpen para facilitar la síntesis de oligonucleótidos y la amplificación por PCR; los sitios óptimos de iniciación de la traducción se incorporan de acuerdo con las reglas de Kozak (Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); y los sitios HindIII están diseñados corriente arriba de los sitios de iniciación de la traducción.

20
25

Para las regiones variables tanto de cadena pesada como ligera, la codificación optimizada y las secuencias de cadena no codificantes correspondientes se descomponen en 30-50 nucleótidos aproximadamente en el punto medio del correspondiente oligonucleótido no codificante. Por lo tanto, para cada cadena, los oligonucleótidos se pueden ensamblar en conjuntos de doble cadena superpuestos que abarcan segmentos de 150-400 nucleótidos. Las agrupaciones se usan a continuación como plantillas para producir productos de amplificación por PCR de 150-400 nucleótidos. Típicamente, un conjunto único de oligonucleótidos de la región variable se dividirá en dos conjuntos que se amplifican por separado para generar dos productos de PCR solapantes. Estos productos superpuestos se combinan luego mediante amplificación por PCR para formar la región variable completa. También puede ser deseable incluir un fragmento solapante de la región constante de la cadena pesada o ligera en la amplificación por PCR para generar fragmentos que pueden clonarse fácilmente en los constructos del vector de expresión.

30
35

Las regiones variables de cadena pesada y ligera quimerizadas o humanizadas reconstruidas se combinan a continuación con secuencias de promotor clonado, guía, iniciación de traducción, región constante, 3' no traducida, poliadenilación y terminación de la transcripción, para formar constructos de vector de expresión. Los constructos de expresión de cadena pesada y ligera se pueden combinar en un único vector, cotransfectarse, transfectarse en serie, o transfectarse por separado en células huésped que luego se fusionan para formar una célula huésped que expresa ambas cadenas. Los plásmidos para uso en la construcción de vectores de expresión para IgGk humana se describen a continuación. Los plásmidos se construyeron de manera que las secuencias de ADNc de la cadena liviana V pesada y V kappa amplificadas por PCR pudieran usarse para reconstruir minigenes completos de cadena pesada y ligera. Estos plásmidos pueden usarse para expresar anticuerpos IgG1, Kappa o IgG4, Kappa completamente humanos o quiméricos. Se pueden construir plásmidos similares para la expresión de otros isotipos de cadena pesada, o para la expresión de anticuerpos que comprenden cadenas livianas lambda.

40

Por tanto, en otro aspecto de la presente enseñanza, las características estructurales de los anticuerpos anti-CLD18 se usan para crear anticuerpos anti-CLD18 humanizados estructuralmente relacionados que retienen al menos una propiedad funcional de los anticuerpos de la invención, tales como la unión a CLD18. Más específicamente, una o más regiones CDR de anticuerpos monoclonales de ratón pueden combinarse de forma recombinante con regiones flanqueantes humanas conocidas y CDR para crear anticuerpos anti-CLD18 humanizados, por ingeniería recombinante adicionales de la invención.

Unión a células que expresan antígeno

45

La capacidad del anticuerpo para unirse a CLD18 puede determinarse usando ensayos de unión convencionales, tales como los expuestos en los ejemplos (por ejemplo, ELISA, inmunotransferencia Western, inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo).

Caracterización de la unión de anticuerpos

50
55

Para purificar anticuerpos anti-CLD18, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces rotatorios de dos litros para la purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, los anticuerpos anti-CLD18 se pueden producir en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden filtrarse y, si es necesario, concentrarse antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida puede controlarse mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alta resolución para garantizar la pureza. La solución reguladora puede intercambiarse en PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 usando el coeficiente de extinción 1.43. Los anticuerpos monoclonales se pueden separar en alícuotas y almacenar a -80°C. Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 seleccionados se unen a epítopos únicos, puede usarse la mutagénesis dirigida al sitio o dirigida a múltiples sitios.

Determinación del isotipo

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden realizar ELISA de isotipo con diversos kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pozos de las placas de microtitulación se pueden recubrir con Ig recolectaron. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificado, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pozos pueden hacerse reaccionar con IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3, IgA de ratón o sondas conjugadas con peroxidasa específicas de IgM de ratón. Después del lavado, las placas pueden desarrollarse con sustrato ABTS (1 mg/ml) y analizarse a una DO de 405-650. Alternativamente, se puede usar el kit de isotipificación de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, Cat. No. 1493027) tal como lo describe el fabricante.

Análisis citométrico de flujo

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD18, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que expresan de forma natural o después de la CLD18 transfección y controles negativos que carecen de expresión de CLD18 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar), se pueden mezclar con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridoma o en PBS que contiene 1% de FBS, y se pueden incubar a 4°C para 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido a CLD18 en las mismas condiciones que la tinción del anticuerpo primario. Las muestras se pueden analizar mediante citometría de flujo con un instrumento FACS que usa propiedades de luz y dispersión lateral para atravesar las células vivas únicas. Con el fin de distinguir anticuerpos monoclonales específicos de la CLD18 de aglutinantes no específicos en una sola medición, se puede emplear el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican CLD18 y un marcador fluorescente pueden teñirse tal como se describió anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente de las células teñidas con anticuerpo. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de la CLD18 se unen preferentemente a las células que expresan el marcador de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una relación comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia además o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se describió anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Las proteínas de unión estrecha tienden a internalizarse, si se pierde el contacto célula-célula con las células vecinas de las células particularmente adherentes, por ejemplo por desprendimiento de células. La expresión en la superficie celular de la CLD18 se puede optimizar a) ajustando las condiciones de cultivo, por ejemplo el cultivo en mayor densidad celular de una manera estandarizada, utilizando desprendimiento suave (por ejemplo EDTA 2 mM/PBS o Accutase), el procesamiento a temperatura ambiente, y la adición de inhibidores de la endocitosis (por ejemplo, azida de sodio) o activadores de la transcripción o de la traducción CLD18, y b) seleccionando y clonando células que mantienen CLD18 en altos niveles en la superficie celular, por ejemplo mediante selección con antibióticos en términos de células transfectadas, mediante clasificación inmunomagnética o de células FACS, y mediante clonación por dilución limitada.

Microscopía de inmunofluorescencia

Para demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD18, se puede usar el análisis por microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, líneas celulares que expresan de forma espontánea o después de la CLD18 transfección y controles negativos que carecen de expresión CLD18 se cultivan en portaobjetos de cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, complementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células pueden fijarse entonces con metanol o paraformaldehído o dejarse sin tratar. Las células pueden reaccionar con anticuerpos monoclonales contra CLD18 durante 30 minutos a 25°C. Después del lavado, las células pueden hacerse reaccionar con un anticuerpo secundario IgG recolectaron marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células pueden luego examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Los niveles totales de la CLD18 en las células se pueden observar cuando las células son fijadas con metanol o fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con Triton X-100. En las células vivas y no permeabilizadas, puede examinarse la localización de la CLD18 a las uniones estrechas por cotinción con marcadores de unión estrecha como ZO-1. Además, se pueden examinar los efectos de la unión del anticuerpo y la localización de la CLD18 dentro de la membrana celular.

Inmunotransferencia Western

Las IgG anti-CLD18 puede analizarse adicionalmente para determinar su reactividad con el antígeno CLD18 mediante inmunotransferencia Western. En resumen, se pueden preparar extractos celulares de células que expresan CLD18 y controles negativos apropiados y someterlos a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se sondearán con los anticuerpos monoclonales que se analizarán. La unión a IgG puede detectarse usando peroxidasa IgG recolectaron y desarrollarse con sustrato ECL.

Inmunohistoquímica

Las IgG de ratón anti-CLD18 pueden analizarse adicionalmente para determinar su reactividad con el antígeno CLD18 mediante inmunohistoquímica de una manera bien conocida por la persona experta, por ejemplo, mediante el uso de criosecciones fijadas con paraformaldehído o parafina o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído, a partir de tejido no canceroso o muestras de tejido canceroso obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos de rutina o de ratones portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLD18 espontáneamente (por ejemplo, DAN-G, SNU- 16, o KATO-III) o después de la transfección (por ejemplo, HEK293). Para la inmunotinción, se pueden incubar anticuerpos reactivos a CLD18 seguidos por anticuerpos de cabra recolectaron o de cabra anti-conejo conjugados con peroxidasa de rábano picante (DAKO) de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

Actividades fagocíticas y de destrucción celular de anticuerpos *in vitro*

Además de unirse específicamente a CLD18, los anticuerpos anti-CLD18 pueden analizarse para determinar su capacidad para mediar en la fagocitosis y la destrucción de células que expresan CLD18. La prueba de la actividad de anticuerpos monoclonales *in vitro* proporcionará una criba inicial antes de probar modelos *in vivo*.

15 Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos se pueden purificar mediante centrifugación por densidad según Ficoll Hypaque, seguida por la lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor o, alternativamente, con 5% de suero humano inactivado por calor y mezclado con células diana marcadas con ^{51}Cr que expresan CLD18, en diversas proporciones de células efectoras para direccionar a las células. Alternativamente, las células diana se pueden marcar con un ligando potenciador de fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de europio con el ligando potenciador que se libera de las células muertas se puede medir con un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células diana con luciferasa. El amarillo lucifer añadido puede ser luego oxidado solo por células viables. Las IgG anti-CLD18 purificadas se pueden agregar luego a diversas concentraciones. La IgG humana irrelevante puede usarse como control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 4 a 20 horas a 37°C, dependiendo del tipo de célula efectora utilizada. Las muestras pueden analizarse para determinar la citólisis midiendo la liberación de ^{51}Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo lucifer puede ser una medida de células viables.

30 Los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 también se pueden analizar en diversas combinaciones para determinar si la citólisis se potencia con múltiples anticuerpos monoclonales.

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

Se puede analizar la capacidad de los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 para mediar CDC usando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento se puede obtener de la sangre de una manera conocida por la persona experta. Para determinar la actividad CDC de los mAbs, se pueden usar diferentes métodos. Por ejemplo, puede medirse la liberación de ^{51}Cr , o puede evaluarse la permeabilidad de membrana elevada usando un ensayo de exclusión con yoduro de propidio (PI). En resumen, las células diana se pueden lavar y se pueden incubar a $5 \times 10^5/\text{ml}$ con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos, a temperatura ambiente o a 37°C. Luego puede agregarse suero o plasma a una concentración final de 20% (v/v) y las células pueden incubarse a 37°C durante 20-30 minutos. Todas las células de cada muestra se pueden agregar a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede analizarse inmediatamente mediante análisis por citometría de flujo usando FACSArray.

En un ensayo alternativo, la inducción de CDC puede determinarse en células adherentes. En una realización de este ensayo, las células se siembran 24 h antes del ensayo con una densidad de $3 \times 10^4/\text{pozo}$ en placas de microtitulación de fondo plano para cultivo de tejidos. Al día siguiente, se elimina el medio de crecimiento y las células se incuban por triplicado con anticuerpos. Las células de control se incuban con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contiene 0.2% de saponina para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, se elimina el sobrenadante y se agrega plasma o suero humano al 20% (v/v) en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incuba durante otros 20 minutos a 37°C. Todas las células de cada muestra se agregan a la solución de yoduro de propidio (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Luego, los sobrenadantes se reemplazan por PBS que contiene 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia por excitación a 520 nm se mide a 600 nm usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calcula de la siguiente manera: % de lisis específica = (fondo de fluorescencia de muestra-fluorescencia)/(fondo de fluorescencia de lisis máxima-fluorescencia) x 100.

Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

55 Para probar la capacidad de iniciar la apoptosis, los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 pueden incubarse, por ejemplo, con células tumorales positivas para CLD18, por ejemplo, células tumorales transfectadas SNU-16, DAN-G, KATO-III o CLD18 a 37°C durante cerca de 20 horas. Las células se pueden cosechar, lavar en regulador de unión a

Anexina-V (BD biosciences) e incubar con anexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante 15 minutos, en la oscuridad. Todas las células de cada muestra pueden agregarse a la solución de PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS y evaluarse inmediatamente mediante citometría de flujo (como se hizo anteriormente). Alternativamente, se puede detectar una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits disponibles comercialmente. El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, No. de catálogo AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta usando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y se desnaturaliza el ADN con la solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida, que utiliza detección por fluorometría resuelta en el tiempo, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

Estudios preclínicos

Los anticuerpos monoclonales que se unen a CLD18 también pueden analizarse en un modelo *in vivo* (por ejemplo, en ratones inmunodeficientes portadores de tumores xenoinjertados inoculados con líneas celulares que expresan CLD18, por ejemplo, DAN-G, SNU-16 o KATO-III, o después transfección, por ejemplo HEK293) para determinar su eficacia en el control del crecimiento de células tumorales que expresan CLD18.

Los estudios *in vivo* después del xenoinjerto CLD18 que expresa las células tumorales en ratones inmunocomprometidos u otros animales se puede realizar usando anticuerpos de la invención. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones libres de tumor seguidos de la inyección de células tumorales para medir los efectos de los anticuerpos para evitar la formación de tumores, o síntomas relacionados con el tumor. Los anticuerpos se pueden administrar a ratones portadores de tumores para determinar la eficacia terapéutica de los anticuerpos respectivos para reducir el crecimiento tumoral, la metástasis o los síntomas relacionados con el tumor. La aplicación de anticuerpos se puede combinar con la aplicación de otras sustancias como fármacos citostáticos, inhibidores del factor de crecimiento, bloqueadores del ciclo celular, inhibidores de la angiogénesis u otros anticuerpos para determinar la eficacia sinérgica y la toxicidad potencial de las combinaciones. Para analizar los efectos secundarios tóxicos mediados por los anticuerpos de la invención, los animales se pueden inocular con anticuerpos o reactivos de control y se pueden investigar exhaustivamente los síntomas posiblemente relacionados con la terapia con anticuerpo CLD18. Los posibles efectos secundarios de la aplicación *in vivo* de anticuerpos CLD18 incluyen particularmente toxicidad en tejidos que expresan CLD18, incluyendo estómago y pulmón. Anticuerpos que reconocen CLD18 en seres humanos y en otras especies, por ejemplo ratones, son particularmente útiles para predecir los efectos secundarios potenciales mediados por la aplicación de anticuerpos CLD18 monoclonales en humanos.

Mapeo de epítomos

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

I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CLD18

En aun otra realización, los anticuerpos para CLD18 pueden derivarse o unirse a otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab') para generar una molécula biespecífica o multispecífica que se une a múltiples sitios de unión o epítomos diana. Por ejemplo, un anticuerpo descrito en este documento puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, mediante acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más moléculas de unión diferentes, tales como otro anticuerpo, péptido o mimético de unión.

Por consiguiente, la presente enseñanza abarca moléculas biespecíficas y multispecíficas que comprenden al menos una primera especificidad de unión para CLD18 y una segunda especificidad de unión para un segundo epítomo diana. En una realización particular de la invención, el segundo epítomo diana es un receptor de Fc, por ejemplo Fc-gammaRI humano (CD64) o un receptor de Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de células T, por ejemplo CD3. Por lo tanto, la invención incluye moléculas biespecíficas y multispecíficas capaces de unirse tanto a células efectoras que expresan Fc-gammaR, Fc-alfaR o Fc-epsilonR (por ejemplo, monocitos, macrófagos o células polimorfonucleares (PMN)), como a células diana que expresan CLD18. Estas moléculas biespecíficas y multispecíficas pueden direccionarse a células que expresan CLD18 a células efectoras y pueden desencadenar actividades de células efectoras mediadas por receptores Fc, tales como fagocitosis de células que expresan CLD18, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), liberación de citoquinas o generación de anión superóxido.

Las moléculas biespecíficas y multispecíficas de la presente enseñanza pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CLD18. En una realización, la tercera especificidad de unión es una parte del factor anti-realce (EF), por ejemplo una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y de ese modo aumenta la respuesta inmune contra la célula diana. La "porción de factor antipotenciación" puede ser un anticuerpo, fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y de ese modo da lugar a una mejora del efecto de los determinantes de unión para el Fc receptor o antígeno de la célula diana. La "parte

del factor antipotenciación" puede unirse a un receptor de Fc o a un antígeno de célula diana. Alternativamente, la parte del factor antirrealce puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las especificidades de unión primera y segunda. Por ejemplo, la porción del factor antipotenciación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que produce una respuesta inmune incrementada contra la célula diana).

En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas descritas en este documento comprenden como especificidad de unión al menos un anticuerpo, que incluye, por ejemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, o Fv de cadena sencilla. El anticuerpo también puede ser un dímero de cadena liviana o de cadena pesada, o cualquier fragmento mínimo del mismo tal como un Fv o una construcción de cadena sencilla como se describe en Ladner et al., Documento US 4,946,778. El anticuerpo también puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina de dominio de unión como se describe en los documentos US2003/0118592 y US 2003/0133939.

En una realización, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente enseñanza comprenden una especificidad de unión por un Fc-gammaR o un Fc-alfaR presente en la superficie de una célula efectora, y una segunda especificidad de unión por un antígeno de célula diana, por ejemplo, CLD18.

En una realización, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en el presente documento, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma localizados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptores transmembrana o solubles que se agrupan en tres clases de receptores de Fc-gamma: Fc gammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) y Fc-gammaRIII (CD16). En una realización preferida, el receptor Fc-gamma es un Fc-gammaRI de alta afinidad humana.

La producción y caracterización de estos anticuerpos monoclonales preferidos son descritas por Fanger et al. en el documento WO 88/00052 y en el documento US 4,954,617. Estos anticuerpos se unen a un epitopo de Fc-gammaRI, Fc-gammaRII o Fc-gammaRIII en un sitio que es distinto del sitio de unión de Fc γ del receptor y, por lo tanto, su unión no está bloqueada sustancialmente por niveles fisiológicos de IgG. Los anticuerpos específicos anti-Fc-gammaRI útiles en esta invención son mAb 22, mAb 32, mAb 44, mAb 62 y mAb 197. En otras realizaciones, el anticuerpo anti-receptor Fc γ es una forma humanizada del anticuerpo monoclonal 22 (H22). La producción y caracterización del anticuerpo H22 se describe en Graziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol. 155 (10): 4996-5002 y WO 94/10332. La línea celular productora de anticuerpos H22 se depositó en la American Type Culture Collection el 4 de noviembre de 1992 bajo la designación HA022CL1 y tiene el número de acceso CRL 11177.

En otras realizaciones preferidas, la especificidad de unión para un receptor de Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor de Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), cuya unión es preferiblemente no bloqueada por inmunoglobulina A humana (IgA). El término "receptor de IgA" pretende incluir el producto génico de un gen alfa (Fc-alfaRI) localizado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembrana empalmadas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc-alfaRI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc-alfaRI tiene una afinidad media para IgA1 e IgA2, que se incrementa con la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H.C. et al. (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc-alfaRI, identificados como A3, A59, A62 y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148: 1764).

Fc-alfaRI y Fc-gammaRI son receptores desencadenantes preferidos para usar en la invención porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5000-100000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) median en la presentación de antígenos mejorada de antígenos, incluidos autoantígenos, direccionados a los mismos.

En otra realización, la molécula biespecífica está compuesta por dos anticuerpos monoclonales de acuerdo con la presente enseñanza que tienen actividades funcionales complementarias, tales como un anticuerpo que funciona predominantemente induciendo CDC y el otro anticuerpo que funciona predominantemente induciendo apoptosis.

Un "anticuerpo específico de célula efectora" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor de Fc de células efectoras.

Los anticuerpos preferidos para uso en la presente invención se unen al receptor de Fc de células efectoras en un sitio que no está unido a inmunoglobulina endógena.

Como se usa en el presente documento, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitivas y de activación de una respuesta inmune. Células inmunes de ejemplo incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citotóxicas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, células polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos. Algunas células efectoras expresan receptores específicos de Fc y llevan a cabo funciones inmunes específicas. En realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por

ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC, por ejemplo, monocitos, macrófagos, que expresan FcR están implicados en la muerte específica de células diana y presentando antígenos a otros componentes del sistema inmune, o uniéndose a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, célula diana, o microorganismo. La expresión de un FcR particular en una célula efectora puede ser regulada por factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, se ha encontrado que la expresión de Fc-gammaRI está regulada positivamente por interferón gamma (IFN- γ). Esta expresión aumentada aumenta la actividad citotóxica de las células que portan Fc-gammaRI contra las dianas. Una célula efectora puede fagocitar o someter a lisis un antígeno diana o una célula diana.

"Célula diana" significará cualquier célula indeseable en un sujeto (por ejemplo, un humano o animal) que pueda ser blanco de un anticuerpo de la invención. En realizaciones preferidas, la célula diana es una célula que expresa o sobreexpresa CLD18. Las células que expresan CLD18 incluyen típicamente células tumorales.

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden prepararse usando técnicas químicas (véase, por ejemplo, D.M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 5807), técnicas de "polidoma" (Ver US 4,474,893, de Reading), o técnicas de ADN recombinante.

En particular, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas pueden prepararse conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-CLD18, usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica puede generarse por separado y luego conjugarse entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes de entrecruzamiento incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), 5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (véase, por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160: 1686, Liu, MA et al (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229: 81-83), y Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Cuando las especificidades de unión son anticuerpos, pueden conjugarse mediante unión por sulfhidrilo de las regiones de bisagra del extremo C de las dos cadenas pesadas. En una realización particularmente preferida, la región de bisagra se modifica para que contenga un número impar de residuos de sulfhidrilo, preferiblemente uno, antes de la conjugación.

Alternativamente, ambas especificidades de unión pueden codificarse en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula anfitriona. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es una proteína de fusión mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica, por ejemplo, una molécula biespecífica, puede ser una molécula de cadena sencilla, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla, una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende un anticuerpo de cadena sencilla y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena única que comprende dos determinantes vinculantes. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas bi y multiespecíficas se describen, por ejemplo, en los documentos US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; y US 5,482,858.

La unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas a sus dianas específicas se puede confirmar mediante ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), análisis FACS, un bioensayo (por ejemplo, inhibición de crecimiento) o un ensayo de inmunotransferencia Western. Cada uno de estos ensayos generalmente detecta la presencia de complejos proteína-anticuerpo de interés particular empleando un reactivo marcado (por ejemplo, un anticuerpo) específico para el complejo de interés. Por ejemplo, los complejos FcR-anticuerpo pueden detectarse usando, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo ligado a una enzima que reconoce y se une específicamente a los complejos anticuerpo-FcR. Alternativamente, los complejos se pueden detectar usando cualquiera de una variedad de otros inmunoensayos. Por ejemplo, el anticuerpo puede marcarse radioactivamente y usarse en un radioinmunoensayo (RIA) (véase, por ejemplo, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986). El isótopo radioactivo se puede detectar por medios tales como el uso de un contador y o un contador de centelleo o por autorradiografía.

II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente enseñanza presenta un anticuerpo anti-CLD18 conjugado con una unidad estructural o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan aquí "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial y, en particular, mata las células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina,

dihidroxiantracnodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos.

Los agentes terapéuticos adecuados para formar inmunocombinados incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, fludarabina, 5-fluorouracilo descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). En una realización preferida, el agente terapéutico es un agente citotóxico o un agente radiotóxico. En otra realización, el agente terapéutico es un inmunosupresor. En aun otra realización, el agente terapéutico es GM-CSF. En una realización preferida, el agente terapéutico es doxorubicina, cisplatino, bleomicina, sulfato, carmustina, clorambucilo, ciclofosfamida o ricina A.

Los anticuerpos de la presente enseñanza también se pueden conjugar a un radioisótopo, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111, para generar productos radiofarmacéuticos citotóxicos para tratar un trastorno relacionado con CLD18, tal como un cáncer. Los combinados de anticuerpos de la invención se pueden usar para modificar una respuesta biológica dada, y el resto del fármaco no debe interpretarse como limitado a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la unidad estructural de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Tales proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina enzimáticamente activa, o un fragmento activo de la misma, tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina de la difteria; una proteína tal como factor de necrosis tumoral o interferón- γ ; o modificadores de la respuesta biológica, como, por ejemplo, linfoquinas, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6"), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos ("GM-CSF"), factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF") u otros factores de crecimiento.

Las técnicas para conjugar dicha unidad estructural terapéutica a anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982).

En una realización adicional, los anticuerpos descritos en este documento están unidos a un enlazador-quelante, por ejemplo, tiuxetan, que permite que el anticuerpo se conjuge con un radioisótopo.

III. Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, la presente enseñanza describe una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos de la presente enseñanza. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables, así como con cualquier otro adyuvante y excipiente conocido de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing. Co., Easton, PA, 1995. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la invención que actúan por diferentes mecanismos, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente induciendo CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente induciendo apoptosis.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en terapia de combinación, es decir, combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir una composición descrita en este documento con al menos un agente antiinflamatorio o al menos un agente inmunosupresor. En una realización, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes antiinflamatorios, tales como un fármaco esteroideo o un AINE (fármaco antiinflamatorio no esteroideo). Los agentes preferidos incluyen, por ejemplo, aspirina y otros salicilatos, inhibidores de Cox-2, tales como rofecoxib (Vioxx) y celecoxib (Celebrex), AINE tales como ibuprofeno (Motrin, Advil), fenoprofeno (Nalfon), naproxeno (Naprosyn), sulindac (Clinoril), diclofenaco (Voltaren), piroxicam (Feldene), ketoprofeno (Orudis), diflunisal (Dolobid), nabumetona (Relafen), etodolac (Lodine), oxaprozina (Daypro) e indometacina (Indocin).

En otra realización, tales agentes terapéuticos incluyen agentes que conducen al agotamiento o inactivación funcional de células T reguladoras, como ciclofosfamida de baja dosis, anticuerpos anti-CTLA4, anticuerpos anti-IL2 o anti-receptor de IL2.

En aun otra realización, tales agentes terapéuticos incluyen uno o más agentes quimioterapéuticos, tales como derivados de Taxol, taxotere, gemcitabina, 5-fluorouracilo, doxorubicina (Adriamicina), cisplatino (Platinol), ciclofosfamida (Cytoxan, Procytox, Neosar). En otra realización, los anticuerpos de la presente invención se pueden administrar en combinación con agentes quimioterapéuticos, que preferiblemente muestran eficacia terapéutica en pacientes que padecen cáncer de estómago, esófago, pancreático y de pulmón.

En aun otra realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar junto con radioterapia y/o trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

5 En aun otra realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar en combinación con uno o más anticuerpos seleccionados de anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EPCAM, anti-EGFR, anti-Her2/neu y anticuerpos anti-CD40.

En aun otra realización, los anticuerpos de la presente enseñanza se pueden administrar en combinación con un anticuerpo anti-C3b (i) para potenciar la activación del complemento.

10 Como se usa en este documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos, y similares que son fisiológicamente compatibles. Preferiblemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, espinal o epidérmica (por ejemplo, mediante inyección o infusión). Dependiendo de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, anticuerpo, molécula biespecífica y multiespecífica, se puede revestir en un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto.

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

20 Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición ácida y sales de adición básicas. Las sales de adición ácida incluyen aquellas derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fósforo y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos mono- y dicarboxílicos, ácidos alcanóico fenil-sustituídos, ácidos hidroxialcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición básicas incluyen aquellas derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

25 Una composición de la presente enseñanza se puede administrar mediante una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la materia, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos pueden prepararse con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados.

30 Se pueden usar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como etilen acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y poliácido láctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

35 Para administrar un compuesto de la presente enseñanza mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario recubrir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones reguladoras acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF de agua en aceite en agua, así como liposomas convencionales (Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol., 7:27).

40 Los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla su uso en las composiciones farmacéuticas descritas en este documento. También se pueden incorporar compuestos activos suplementarios en las composiciones.

45 Las composiciones terapéuticas típicamente deben ser estériles y estables bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición se puede formular como una solución, microemulsión, liposoma u otra estructura ordenada adecuada para una alta concentración de fármaco. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de microfiltración por esterilización.

5 En general, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y liofilización (liofilización) que producen un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente esterilizada filtrada del mismo.

10 Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta óptima deseada (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, puede administrarse un único bolo, pueden administrarse varias dosis divididas a lo largo del tiempo o la dosis puede reducirse o aumentarse proporcionalmente según lo indicado por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación como se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos por tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que debe lograrse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

20 Ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfito de sodio, sulfito de sodio y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

25 Para las composiciones terapéuticas, las formulaciones de la presente enseñanza incluyen las adecuadas para administración oral, nasal, tópica (que incluye bucal y sublingual), rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se pueden preparar mediante cualquier método conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación variará dependiendo del sujeto que se está tratando, y el modo particular de administración. La cantidad de ingrediente activo que se puede combinar con un material de vehículo para producir una única forma de dosificación generalmente será la cantidad de la composición que produce un efecto terapéutico.

30 Generalmente, de un cien por ciento, esta cantidad variará de aproximadamente 0.01 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de ingrediente activo, preferiblemente de aproximadamente 0.1 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, lo más preferiblemente de aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

35 Las formulaciones de la presente enseñanza que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen dichos vehículos que se conocen en la técnica como apropiados. Las formas de dosificación para la administración tópica o transdérmica de las composiciones de esta invención incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, regulador o propelente que pueda ser necesario.

40 Las expresiones "administración parenteral" y "administradas por vía parenteral" como se usan en el presente documento significa modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, Inyección e infusión intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

45 Ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

50 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos se puede asegurar tanto mediante procedimientos de esterilización, como mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción

prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede conseguirse mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

En una realización, los anticuerpos monoclonales descritos en el presente documento se administran en forma cristalina mediante inyección subcutánea, por ejemplo, Yang et al. (2003) PNAS, 100(12): 6934-6939. Cuando los compuestos de la presente enseñanza se administran como productos farmacéuticos, a humanos y animales, se pueden administrar solos o como una composición farmacéutica que contiene, por ejemplo, 0.01 a 99.5% (más preferiblemente, 0.1 a 90%) de ingrediente activo en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable.

Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente enseñanza, que pueden usarse en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, se formulan en formas de dosificación farmacéuticamente aceptables por métodos convencionales conocidos por aquellos de habilidad en la técnica.

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin ser tóxicos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se está empleando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, el estado, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Un médico o veterinario que tenga una experiencia normal en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad efectiva de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar dosis de los compuestos de la presente enseñanza empleados en la composición farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una composición de la invención será aquella cantidad del compuesto que sea la dosis más baja efectiva para producir un efecto terapéutico. Dicha dosis efectiva generalmente dependerá de los factores descritos anteriormente. Se prefiere que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, preferiblemente administrada proximal al sitio de la diana. Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición terapéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en formas de dosificación unitarias. Si bien es posible que un compuesto de la presente invención se administre solo, es preferible administrar el compuesto como una formulación (composición) farmacéutica.

En una realización, los anticuerpos descritos en este documento pueden administrarse por infusión, preferiblemente infusión continua lenta durante un período prolongado, tal como más de 24 horas, con el fin de reducir los efectos secundarios tóxicos. La administración también puede realizarse por infusión continua durante un período de 2 a 24 horas, como de 2 a 12 horas. Tal régimen puede repetirse una o más veces según sea necesario, por ejemplo, después de 6 meses o 12 meses. La dosificación puede determinarse o ajustarse midiendo la cantidad de anticuerpos monoclonales anti-CLD18 circulantes tras la administración en una muestra biológica usando anticuerpos antiidiotípicos que se dirigen a los anticuerpos anti-CLD18.

En aun otra realización, los anticuerpos se administran mediante terapia de mantenimiento, tal como, por ejemplo, una vez a la semana durante un período de 6 meses o más.

En aun otra realización, los anticuerpos de acuerdo con la invención se pueden administrar mediante un régimen que incluye infusión de un anticuerpo contra CLD18 seguida de infusión de un anticuerpo contra CLD18 conjugado a un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, de 7 a 9 días más tarde.

Las composiciones terapéuticas se pueden administrar con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición terapéutica de la invención se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en el documento US 5,399,163; US 5,383,851; US 5,312,335; US 5,064,413; US 4,941,880; US 4,790,824; o US 4,596,556. Ejemplos de implantes y módulos bien conocidos útiles en la presente invención incluyen los descritos en: US 4,487,603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicamentos a una velocidad controlada; US 4,486,194, que divulga un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; US 4,447,233, que divulga una bomba de infusión de medicación para suministrar medicación a una velocidad de infusión precisa; US 4,447,224, que divulga un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármacos; US 4,439,196, que divulga un sistema de suministro de fármaco osmótico que tiene compartimentos de cámaras múltiples; y US 4,475,196, que divulga un sistema de administración osmótica de fármacos.

Muchos otros implantes, sistemas de suministro y módulos de este tipo son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la invención se pueden formular para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la invención crucen la BBB (si se desea), se pueden formular, por

ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, US 4,522,811; US 5,374,548; y US 5,399,331. Los liposomas pueden comprender uno o más unidades estructurales que se transportan selectivamente a células u órganos específicos y, de este modo, potencian la administración dirigida del fármaco (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol., 29: 685). Unidades estructurales de direccionamiento de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, el documento US 5,416,016 de Low et al.); manosidas (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140; M. Owais et al (1995) Antimicrob. Agents Chemother., 39: 180); y el receptor de proteína A surfactante (Briscoe et al (1995) Am. J. Physiol. 1233: 134).

En una realización, los compuestos terapéuticos de la invención se formulan en liposomas. En una realización más preferida, los liposomas incluyen una unidad estructural de direccionamiento. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran por inyección en bolo a un sitio proximal al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos como bacterias y hongos.

En una realización adicional, los anticuerpos se pueden formular para prevenir o reducir su transporte a través de la placenta. Esto se puede hacer mediante métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante PEGilación de los anticuerpos o mediante el uso de fragmentos F(ab)₂. Se pueden hacer referencias adicionales a "Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) Biological activities of polyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J. Immunol. Methods, 152: 177-190; y a "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann. Allergy Asthma Immunol. 74: 279-283.

Se puede medir una "dosificación terapéuticamente efectiva" para la terapia tumoral por respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (RC) se define como una evidencia no clínica, radiológica u otra de enfermedad. Una respuesta parcial (RP) resulta de una reducción en el tamaño total del tumor de más del 50%. La media del tiempo a la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta tumoral objetiva.

Una "dosificación terapéuticamente efectiva" para terapia tumoral también puede medirse por su capacidad para estabilizar la progresión de la enfermedad. La capacidad de un compuesto para inhibir el cáncer se puede evaluar en un sistema modelo animal que predice la eficacia en tumores humanos. Alternativamente, esta propiedad de una composición puede evaluarse examinando la capacidad del compuesto para inhibir el crecimiento celular o la apoptosis mediante ensayos *in vitro* conocidos por el experto en la técnica. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto terapéutico puede disminuir el tamaño del tumor, o mejorar de otro modo los síntomas en un sujeto. Un experto en la materia podría determinar tales cantidades basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y la composición o vía de administración particular seleccionada.

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición se pueda administrar con una jeringa. Además de agua, el vehículo puede ser una solución salina regulada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir en la composición agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede realizarse incluyendo en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

Cuando el compuesto activo está adecuadamente protegido, como se describió anteriormente, el compuesto puede administrarse por vía oral, por ejemplo, con un diluyente inerte o un vehículo comestible asimilable.

IV. Usos y métodos de la invención

Los anticuerpos (incluyendo inmunoconjugados, biespecíficos/multiespecíficos, composiciones y otros derivados descritos en este documento) de la presente enseñanza tienen numerosas utilidades terapéuticas que implican el tratamiento de trastornos que implican células que expresan CLD18. Por ejemplo, los anticuerpos pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo, *in vitro* o *ex vivo*, o a sujetos humanos, por ejemplo, *in vivo*, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como los descritos en este documento. Como se usa en este documento, el término "sujeto" pretende incluir animales humanos y no humanos que responden a los anticuerpos contra CLD18. Los sujetos preferidos incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse matando células enfermas, en particular células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de la CLD18 en comparación con células normales.

Un efecto terapéutico en los tratamientos discutidos en este documento se logra preferiblemente a través de las propiedades funcionales de los anticuerpos de la presente enseñanza para mediar en la destrucción de células, por ejemplo induciendo lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.

Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos pueden usarse para tratar a un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CLD18 que incluye, por ejemplo, cáncer gástrico. Ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y prevenirse abarcan todos los cánceres y entidades tumorales que expresan CLD18, incluyendo cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de vesícula biliar y cáncer de cabeza y cuello. Estos cánceres pueden estar en etapas temprana, intermedia o avanzada, por ejemplo metástasis.

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento de la presente invención también pueden usarse para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en este documento.

En otra realización, los anticuerpos descritos en este documento pueden usarse para detectar niveles de la CLD18 o formas particulares de la CLD18, o niveles de células que contienen CLD18 en su superficie de membrana, niveles que pueden vincularse a ciertas enfermedades o síntomas de enfermedad tales como describo arriba. Alternativamente, los anticuerpos pueden usarse para reducir o interactuar con la función de las células que expresan CLD18, implicando de este modo a estas células como importantes mediadores de la enfermedad. Esto puede lograrse poniendo en contacto una muestra y una muestra de control con el anticuerpo anti-CLD18 en condiciones que permitan la formación de un complejo entre el anticuerpo y CLD18. Cualquier complejo formado entre el anticuerpo y CLD18 se detecta y se compara en la muestra y una muestra de control, es decir, una muestra de referencia.

Los anticuerpos de la enseñanza se pueden probar inicialmente en cuanto a su actividad de unión asociada con usos terapéuticos o de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos pueden analizarse usando ensayos de citometría de flujo como se describe en este documento.

Además, se puede analizar la actividad de los anticuerpos para desencadenar al menos una actividad de célula efectora mediada por efector, que incluye inhibir el crecimiento y/o destruir células que expresan CLD18. Por ejemplo, se puede analizar la capacidad de los anticuerpos para desencadenar CDC y/o apoptosis. En este documento se describen los protocolos para analizar CDC, adhesión homotípica, agrupamiento molecular o apoptosis.

Los anticuerpos de la invención se pueden usar para provocar *in vivo* o *in vitro* una o más de las siguientes actividades biológicas: inhibir el crecimiento y/o la diferenciación de una célula que expresa CLD18; matar una célula que expresa CLD18; mediar en la fagocitosis o ADCC de una célula que expresa CLD18 en presencia de células efectoras; mediar CDC de una célula que expresa CLD18 en presencia de complemento; mediar la apoptosis de una célula que expresa CLD18; inducir la adhesión homotípica; y/o inducir la translocación en balsas lipídicas tras la unión de la CLD18.

En una realización particular, los anticuerpos se usan *in vivo* o *in vitro* para tratar, prevenir o diagnosticar una variedad de enfermedades relacionadas con CLD18. Ejemplos de enfermedades relacionadas con CLD18 incluyen, entre otros, cánceres tales como cáncer gástrico, cáncer de páncreas, cáncer de esófago, cáncer de pulmón y cánceres como los enumerados anteriormente.

CLD18A2 también se expresa en células estomacales normales diferenciadas. Posibles efectos secundarios clínicos inducidos por anticuerpos mediante la muerte de estas células pueden reducirse o evitarse mediante la administración paralela de fármacos protectores del estómago tales como antiácidos o inhibidores de la bomba de protones gástricos tales como omeprazol o fármacos relacionados.

Las rutas adecuadas de administración de las composiciones de anticuerpos de la invención *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden ser seleccionadas por los expertos en la técnica.

Como se describió anteriormente, los anticuerpos anti-CLD18 de la invención pueden coadministrarse con uno u otros agentes terapéuticos más, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunes contra los anticuerpos de la invención. El anticuerpo se puede unir al agente (como un inmunocomplejo) o se puede administrar separado del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede administrarse conjuntamente con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, radiación. Dichos agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos tales como los listados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-CLD18 de la presente invención con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerosos que funcionan a través de diferentes mecanismos que producen un efecto citotóxico para las células tumorales. Dicha coadministración puede resolver problemas debido al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que los haría no reactivos con el anticuerpo.

En otra realización particular, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente antiangiogénico que incluye anticuerpos dirigidos a VEGF o VEGFR y uno o más compuestos químicos que inhiben la angiogénesis. El tratamiento previo o la aplicación paralela de estos medicamentos pueden mejorar la penetración de anticuerpos en tumores completos.

En otra realización particular, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un compuesto que inhibe la señalización del receptor del factor de crecimiento que incluye anticuerpos monoclonales que se unen al

receptor EGFR así como compuestos químicos que inhiben la señalización iniciada por EGFR, Her1 o Her2/neu receptor.

5 Las células efectoras específicas diana, por ejemplo, células efectoras unidas a composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas) descritas en el presente documento, también pueden usarse como agentes terapéuticos. Las células efectoras para el direccionamiento pueden ser leucocitos humanos tales como macrófagos, neutrófilos o monocitos. Otras células incluyen eosinófilos, células asesinas naturales y otras células portadoras de receptores de IgG o IgA. Si se desea, pueden obtenerse células efectoras del sujeto por tratar. Las células efectoras específicas de diana se pueden administrar como una suspensión de células en una solución fisiológicamente aceptable. El número de células administradas puede ser del orden de 10^8 a 10^9 , pero variará dependiendo del propósito terapéutico. En general, la cantidad será suficiente para obtener la localización en la célula diana, por ejemplo, una célula tumoral que expresa CLD18, y para efectuar la destrucción celular mediante, por ejemplo, fagocitosis. Las rutas de administración también pueden variar.

15 La terapia con células efectoras específicas de diana puede realizarse junto con otras técnicas para la eliminación de células diana. Por ejemplo, la terapia antitumoral que usa las composiciones de la invención y/o las células efectoras armadas con estas composiciones se puede usar junto con quimioterapia. Además, la inmunoterapia combinada se puede usar para direccionar dos poblaciones efectoras citotóxicas distintas hacia el rechazo de células tumorales. Por ejemplo, los anticuerpos anti-CLD18 unidos a anti-Fc-RI o anti-CD3 pueden usarse junto con agentes de unión específicos de receptor de IgG o IgA.

20 Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también se pueden usar para modular niveles de Fc-gammaR o Fc-alfaR en células efectoras, por ejemplo, protegiendo y eliminando receptores en la superficie celular. Las mezclas de receptores anti-Fc también se pueden usar para este propósito.

25 Las composiciones (por ejemplo, anticuerpos, moléculas multiespecíficas y biespecíficas e inmunoconjugados) descritas en el presente documento que tienen sitios de unión al complemento, tales como porciones de IgG1, -2, o -3 o IgM que se unen al complemento, también se pueden usar en presencia de complemento. En una realización, el tratamiento *ex vivo* de una población de células que comprenden células diana con un agente de unión de la invención y células efectoras apropiadas se puede complementar mediante la adición de complemento o complemento que contiene suero. La fagocitosis de las células diana recubiertas con un agente de unión de la invención se puede mejorar mediante la unión de las proteínas del complemento. En otra realización, las células diana recubiertas con las composiciones de la invención también pueden someterse a lisis por el complemento. En aun otra realización, las composiciones de la presente enseñanza no activan el complemento.

30 Las composiciones de la presente enseñanza también pueden administrarse junto con complemento. De acuerdo con lo anterior, dentro del alcance de la divulgación están las composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas porque el complemento se localiza muy cerca de los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

35 Alternativamente, los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas de la presente enseñanza y el complemento o suero se pueden administrar por separado. La unión de las composiciones de la presente enseñanza a las células diana puede causar la translocación del complejo antígeno-anticuerpo CLD18 en balsas lipídicas de la membrana celular. Dicha translocación crea una alta densidad de complejos antígeno-anticuerpo que pueden activar y/o mejorar CDC de manera eficiente.

40 También dentro del alcance de la presente enseñanza se encuentran kits que comprenden las composiciones de anticuerpos de la invención (por ejemplo, anticuerpos e inmunoconjugados) e instrucciones de uso. El kit puede contener adicionalmente uno o más reactivos adicionales, tales como un reactivo inmunosupresor, un agente citotóxico o un agente radiotóxico, o uno o más anticuerpos adicionales de la invención (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una actividad complementaria).

45 De acuerdo con lo anterior, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos pueden administrarse adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la invención) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que potencia o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos.

50 En otras realizaciones, el sujeto puede tratarse adicionalmente con un agente que modula, por ejemplo, potencia o inhibe, la expresión o actividad de los receptores Fc-gamma o Fc-alfa, por ejemplo, tratando al sujeto con una citoquina. Las citoquinas preferidas incluyen factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral (TNF). Otros agentes importantes para aumentar la eficacia terapéutica de los anticuerpos y composiciones farmacéuticas descritos en la presente son β -glucanos que son homopolisacáridos de residuos de glucosa ramificada y son producidos por una variedad de plantas y microorganismos, por ejemplo, bacterias, algas, hongos, levaduras y granos. También se pueden usar fragmentos de β -glucanos producidos por organismos. Preferiblemente, el β -glucano es un polímero de $\beta(1,3)$ glucosa en donde al menos algunas de las unidades de glucosa de la cadena principal, por ejemplo 3-6% de las unidades de glucosa de su esqueleto, poseen ramificaciones tales como ramificaciones $\beta(1,6)$.

5 En una realización particular, la enseñanza proporciona métodos para detectar la presencia de antígeno CLD18 en una muestra, o medir la cantidad de antígeno CLD18, que comprende poner en contacto la muestra, y una muestra de control, con un anticuerpo que se une específicamente a CLD18, en condiciones que permiten la formación de un complejo entre el anticuerpo o parte del mismo y CLD18. Luego se detecta la formación de un complejo, en donde la formación de un complejo de diferencia entre la muestra en comparación con la muestra de control es indicativa de la presencia del antígeno CLD18 en la muestra.

10 En aun otra realización, la enseñanza proporciona un método para detectar la presencia o cuantificar la cantidad de células que expresan CLD18 *in vivo* o *in vitro*. El método comprende (i) administrar a un sujeto una composición de la enseñanza, conjugada con un marcador detectable; (ii) exponer al sujeto a un medio para detectar dicho marcador detectable para identificar áreas que contienen células que expresan CLD18.

15 Los métodos descritos anteriormente son útiles, en particular, para diagnosticar enfermedades relacionadas con CLD18 y/o la localización de enfermedades relacionadas con CLD18 tales como enfermedades de cáncer. Preferiblemente, una cantidad de la CLD18, preferiblemente CLD18-A2 en una muestra que es mayor que la cantidad de la CLD18, preferiblemente CLD18-A2, en una muestra control es indicativa de la presencia de una enfermedad relacionada con CLD18 en un sujeto, en particular un humano, de quien se deriva la muestra.

En aun otra realización, los inmunoconjugados pueden usarse para direccionar compuestos (por ejemplo, agentes terapéuticos, marcadores, citotoxinas, inmunosupresores de radiotoxinas, etc.) a células que tienen CLD18 expresada en su superficie uniendo tales compuestos al anticuerpo. Por lo tanto, la enseñanza también proporciona métodos para localizar células *ex vivo* o *in vitro* que expresan CLD18, tales como células tumorales circulantes.

20 La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos:

Ejemplos

1. Generación de anticuerpos murinos contra CLD18

a. Inmunizaciones:

25 Se inmunizaron ratones Balb/c y C57/BL6 con vectores de expresión eucariotas, que codificaban fragmentos de la CLD18 humana (SEQ ID NO: 15, 16; 17, 18). Se inyectaron 50 µg o 25 µg de ADN plasmídico en el cuádriceps (intramuscular, i.m.) los días 1 y 10 para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto 1 o alternativamente en los días 1 y 9, 1 y 11, o 1, 16 y 36 para generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto 2 en presencia de adyuvantes, por ejemplo, CpG (para detalles véase Tabla 1b). Se inyectaron intramuscularmente CpG así como las células transfectadas con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) solas o cotransfectadas adicionalmente con ARN que codifica CD40L soluble murina, se inyectó PEI-Man por vía intramuscular o intraperitoneal. La presencia de anticuerpos dirigidos contra CLD18 humana en sueros de ratones se controló mediante microscopía de inmunofluorescencia entre los días 16 y 43, dependiendo del protocolo de inmunización específico utilizado. La inmunofluorescencia se determinó usando células HEK293 transfectadas transitoriamente con un ácido nucleico que codifica una construcción de fusión que comprende la CLD18A2 humana (SEQ ID NOs: 1, 2) y una proteína indicadora fluorescente. Los ratones con respuestas inmunes detectables (Fig. 1) se reforzaron tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto 1, o los ratones se reforzaron tres días, tres y dos días, o los ratones se reforzaron cuatro, tres y dos días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto 2 mediante inyección intraperitoneal de 5 x 10⁷ o alternativamente 1 x 10⁸ células HEK293 transfectadas transitoriamente con un ácido nucleico que codifica CLD18A2 humana (SEQ ID NOs: 1, 2) (para detalles véase la Tabla 1b). En Tab. 1a los protocolos de inmunización usados están dedicados a los respectivos anticuerpos monoclonales.

Tabla. 1a: Protocolos de inmunización utilizados para la generación de anticuerpos monoclonales

mAB	Protocolo de inmunización*	mAB	Protocolo de inmunización
Conjunto 1			
24H5	40	42E12	45
26B5	40	43A11	45
26D12	40	44E10	45
28D10	40	47D12	45

ES 2 675 375 T3

mAB	Protocolo de inmunización*		mAB	Protocolo de inmunización	
Conjunto 1					
37G11	45		61C2	45	
37H8	45		75B8	6	
38G5	45		85A3	6	
38H3	45		9E8	40	
39F11	45		19B9	40	
41C6	45				
Conjunto 2					
45C1	53		166E2	51	
125E1	45		175D10	51	
163E12	51				
*Para protocolos de inmunización específicos, véase Tab. 1b					

Tabla 1b: Protocolos detallados de inmunización

Protocolo de inmunización	Inmunización (inicio y refuerzo con ADN)			Suero - monitorización	Refuerzo con células transfectadas		
	con vectores de ADN que codifican fragmentos CLD18	con adyuvante	en el día		en el día	Células transfectadas solo con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1)	Células cotransfectadas con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) y con CD40L soluble murino que codifica ARN
6	SEQ ID NO: 15:50 μ g	50 μ g CpG	1 y 10	18	5 x 10 ⁷ células MC3T3 transfectadas	ninguna	3
40	SEQ ID NO: 17:50 μ g	50 μ g CpG	1 y 10	18		5 x 10 ⁷ células HEK293; 100 μ g de CPG como adyuvante	3
45	SEQ ID NO: 15:50 μ g	50 μ g CpG	1 y 9	16		1 x 10 ⁸ células HEK293	3

Protocolo de inmunización	Inmunización (inicio y refuerzo con ADN)			Suero - monitorización	Refuerzo con células transfectadas		
	con vectores de ADN que codifican fragmentos CLD18	con adyuvante	en el día		en el día	Células transfectadas solo con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1)	Células cotransfectadas con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) y con CD40L soluble murino que codifica ARN
51	SEQ ID NO: 15:25 µg	2.5 µl PEI-Man* (150 mM) en H ₂ O con 5% de glucosa	1, 16 y 36	22, 30 y 43	5 x 10 ⁷ células HEK293 transfectadas	ninguna	3 y 2
53	Cebado: SEQ ID NO: 15:25 µg, y SEQ ID NO: 17:25 µg; Impulso: SEQ ID NO: 17:50 µg	50 µg CpG en H ₂ O con 5% de glucosa	1 y 11	20	5 x 10 ⁷ células HEK293 transfectadas	ninguna	4, 3 y 2
* in vivo-jetPEI™ -Man de PolyPlus Transfección							

b. Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales humanos para CLD18:

Se aislaron esplenocitos de ratón y se fusionaron con PEG a una línea de células de mieloma de ratón basándose en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se cribaron a continuación para la producción de inmunoglobulinas con especificidad de la CLD18 usando células HEK293 transfectadas con un ácido nucleico que codifica CLD18 humana por análisis FACS.

Se fusionaron suspensiones de células individuales de linfocitos esplénicos de ratones inmunizados con células de mieloma de ratón no secretoras P3X63Ag8U.1 (ATCC, CRL 1597) en una relación 2:1 usando PEG al 50% (Roche Diagnostics, CRL 738641). Las células se sembraron a aproximadamente 3 x 10⁴/pozo en placas de microtitulación de fondo plano, seguido de una incubación de aproximadamente dos semanas en medio selectivo que contenía suero fetal bovino al 10%, fusión de hibridoma al 2% y suplemento de clonación (HFCS, Roche Diagnostics, CRL 1 363 735) más 10 mM de HEPES, 0.055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 µg/ml de gentamicina y 1x de HAT (Sigma, CRL H0262). Después de 10 a 14 días, los pozos individuales se cribaron por citometría de flujo para anticuerpos monoclonales anti-CLD18. Los hibridomas que secretan anticuerpos se sembraron, se cribaron de nuevo y, si todavía eran positivos para los anticuerpos monoclonales anti-CLD18, se subclonaron por dilución limitante. Los subclones estables se cultivaron *in vitro* para generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejidos para la caracterización. Se eligió al menos un clon de cada hibridoma, que retuvo la reactividad de las células progenitoras (por FACS). Se generaron 9 bancos de células de vial para cada clon y se almacenaron en nitrógeno líquido.

c. Selección de anticuerpos monoclonales que se unen a CLD18:

Para determinar el isotipo de anticuerpos, se realizó un ELISA de isotipo. Se usó el kit de identificación de monoAB de ratón (Zymed, CRL 90-6550) o alternativamente el kit de isotipificación de anticuerpo monoclonal de ratón IsoStrip (Roche, Cat. No. 1493027) para determinar las subclases de Ig de los anticuerpos monoclonales reactivos CLD18 identificados.

Definidas como Conjunto 1, se generaron diecinueve líneas celulares de hibridoma, seis de una fusión de células de un ratón C57/BL6 inmunizado con CLD18A2-Bucle D3 (SEQ ID NOs: 17, 18), trece de una fusión de células de un Balb/c ratón inmunizado con CLD18A2-Bucle 1 (SEQ ID NOs: 15, 16), que expresan los siguientes anticuerpos:

24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9

- 24H5: IgG2b monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-034
- 26B5: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-035, DSM ACC2745
- 26D12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-036, DSM ACC2746
- 28D10: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-040, DSM ACC2747
- 5 37G11: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-055, DSM ACC2737
- 37H8: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-056, DSM ACC2738
- 38G5: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-057, DSM ACC2739
- 38H3: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-058, DSM ACC2740
- 39F11: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-059, DSM ACC2741
- 10 41C6: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-060
- 42E12: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-061, DSM ACC2748
- 43A11: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-062, DSM ACC2742
- 44E10: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-063
- 47D12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-064
- 15 61C2: IgG2b monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-067, DSM ACC2743
- 75B8: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D756-001
- 85A3: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D756-002
- 9E8: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-011
- 19B9: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-024
- 20 Definidas como Conjunto 2, se generaron cinco líneas celulares de hibridoma, una de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle D3 (SEQ ID NOs: 17, 18) y CLD18A2-Bucle D1 (SEQ ID NOs: 15, 16), cuatro de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle D1 (SEQ ID NOs: 15, 16), que expresan los siguientes anticuerpos:
- 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10
- 25 45C1: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-187
- 125E1: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-279, DSM ACC2808
- 163E12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-294, DSM ACC2809
- 166E2: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-308
- 175D10: IgG1 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-362, DSM ACC2810
- 30 2. Producción de anticuerpos monoclonales
- Producción y purificación de anticuerpos monoclonales reactivos a CLD18:
- Para producir cantidades del orden de mg de anticuerpo para la caracterización funcional, se sembraron células de hibridoma en biorreactores basados en diálisis (CELLLine CL1000, Integra, Chur, CH) a 2×10^6 células/ml. El sobrenadante que contenía anticuerpo se recolectó una vez a la semana. El anticuerpo monoclonal de ratón se purificó usando Melon Gel (Pierce, Rockford, Estados Unidos) y se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio o, alternativamente, se purificó mediante Proteína A usando FPLC. La concentración y pureza del anticuerpo se determinó mediante ensayo BCA y se verificó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción con Coomassie.
- 35
3. Características de unión de los anticuerpos monoclonales
- 40 a. Control de calidad de transfectantes en WB, IF:
- Para generar células que expresan CLD18A2, se transfectaron células HEK293 o CHO con ácidos nucleicos que codifican CLD18A2 (SEQ ID NOs: 1, 2) o CLD18A2-myc (SEQ ID NOs: 3,4).

Se transfectaron células HEK293 con CLDN18A2-myc (SEQ ID NOs: 3, 4) o se dejaron sin transfectar. 24 horas después de la transfección, las células se recolectaron, se sometieron a lisis y se sometieron a electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio. El gel se secó y se tiñó con un anticuerpo anti-myc de ratón. Después de la incubación con un anticuerpo anti-ratón marcado con peroxidasa, la transferencia se desarrolló con reactivo ECL y se visualizó usando un dispositivo de imágenes LAS-3000 (Fuji). Solo en las células transfectadas, pero no en el control negativo, se observó una banda con el peso molecular esperado de la CLD18-myc (Fig. 2).

Se transfectaron células CHO con CLD18A2 (SEQ ID NOs: 1, 2) y se cultivaron en portaobjetos de cámara durante 24 h. Las células se fijaron con metanol y se tiñeron con un anticuerpo policlonal de conejo contra CLD18 a 1 µg/ml durante 60 minutos a 25°C. Después del lavado, las células se tiñeron con IgG anti-conejo de cabra marcada Alexa488 (Molecular Probes) y se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia. La Figura 3 muestra células CHO transfectadas, que expresan CLD18 en la membrana celular, así como células no transfectadas.

Estas células que expresan CLD18 heteróloga se usaron para los siguientes ensayos para probar la especificidad de la unión del anticuerpo.

b. Selección de anticuerpos monoclonales que se unen a CLD18/cribas primarias mediante citometría de flujo:

Se cotransfectaron células HEK293 con vectores de expresión que codifican CLD18A2 humana (SEQ ID NOs: 1, 2) y una proteína indicadora fluorescente 40 h antes del ensayo o alternativamente se usaron células HEK293 que expresaban de manera estable CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2) y se contratiñeron con yoduro de propidio (PI). Después de la separación celular usando células EDTA/PBS 2 mM, se lavó con medio de crecimiento completo y se sembró a aproximadamente $1-5 \times 10^5$ células/pozo en placas de microtitulación de fondo en U. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadante de hibridoma seguido de dos etapas de lavado con FBS/PBS activado al calor al 1% y finalmente incubación con APC o anticuerpo secundario específico de IgG recolectaron conjugado con Alexa647. Después de dos etapas de lavado, las células cotransfectadas se fijaron con CellFIX (BD Biosciences). La unión se evaluó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAarray. La expresión del marcador de fluorescencia se representa gráficamente en el eje horizontal contra la unión del anticuerpo en el eje vertical. Todos los anticuerpos de ratón 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, y se detectaron 175D10 unidos específicamente a la superficie de células que expresan marcadores de fluorescencia (Figura 4, células en Q2) como se ejemplifica para sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos monoclonales 24H5 (Figura 4A, células en Q2), 85A3 (Figura 4B), 175D10, 125E1, 163E12, 166E2 y 45C1 (Figura 4C, células en Q1).

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

Se especificaron adicionalmente las características de unión de los anticuerpos monoclonales específicos de la CLD18 identificados. Por lo tanto, se analizó la unión del anticuerpo monoclonal a los mutantes CLD18A2, creados mediante la inserción de etiquetas epitópicas. CLD18A2-HA (SEQ ID NO: 6) contiene una etiqueta HA-epitopo en CLD18A2-bucle 1, mientras que la CLD18A2-Myc (SEQ ID NO: 4) contiene una etiqueta Myc-epitopo insertada en CLD18A2-bucle 2. Como la inserción de estas etiquetas provoca la destrucción de epitopos, los anticuerpos monoclonales identificados se pueden agrupar de acuerdo con la pérdida de unión a cualquiera de los mutantes. Las células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 humana, o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-HA, o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-Myc se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales específicos de la CLD18 durante 30 minutos a 4°C, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG recolectaron conjugado con Alexa647. Antes del análisis en un BD FACSAarray, las células se fijaron usando CellFIX. Como se ejemplifica para 24H5, 9E8, 26B5 y 19B9 en la Figura 5, los anticuerpos monoclonales podrían separarse en función de sus características de unión en cuatro grupos diferentes: (i) anticuerpos que se unen a CLD18A2 no modificada así como a CLD18A2-HA y CLD18A2-Myc, por ejemplo 24H5, (Figura 5A), o (ii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA, por ejemplo 9E8, (Figura 5B), o (iii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-Myc, por ejemplo 26B5, (Figura 5C), o (iv) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA ni a CLD18A2-Myc, por ejemplo 19B9, (Figura 5D).

d. Comparación de la unión de anticuerpos a CLD18A1 humana frente a transfectantes CLD18A2 por citometría de flujo:

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales identificados a las isoformas CLD18A2 se analizó mediante citometría de flujo. Se incubaron células HEK293 que expresan de manera estable CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) y células HEK293 que expresan de manera estable CLD18A1 humana (SEQ ID NOs: 7, 8) (HEK293-CLD18A1) durante 30 minutos a 4°C con sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos monoclonales, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con Alexa647 y fijación de células o alternativamente sin fijación, pero con contratiñencia con PI. La unión se evaluó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAarray. La Figura 6 muestra ejemplos para los dos grupos de anticuerpos monoclonales que se identificaron en el panel compuesto por 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10: (i) los anticuerpos monoclonales 43A11, 45C1 y 163E12 se unen específicamente a CLD18A2 humana, pero no a CLD18A1 humana (Figuras 6A, B) y (ii) el anticuerpo monoclonal 37H8 se une a ambas isoformas humanas (Fig. 6A).

e. Comparación de la unión de anticuerpos a CLD18A1 humana frente a CLD18A2 transfectantes, por microscopía de inmunofluorescencia:

Se transfectaron transitoriamente células HEK293 con un vector de expresión que codifica una proteína de fusión de la CLD18A1 (SEQ ID NO: 8) o CLD18A2 (SEQ ID NO: 2) con un indicador de fluorescencia y se cultivaron en portaobjetos de cámara. Las células se tiñeron sin fijar o después de la fijación de paraformaldehído con anticuerpo monoclonal que contenía sobrenadante de cultivo de tejido durante 30 minutos a 37°C. Después del lavado, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-Ig de ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes). La unión de anticuerpos se evaluó mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 7, el anticuerpo 37G11 reaccionó específicamente con CLD18A2 (Figura 7A) pero no con CLD18A1 (Figura 7B). Por el contrario, el anticuerpo 26B5 era reactivo con ambos, CLD18A2 y CLD18A1 (Figura 8).

Para anticuerpos 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, se observó una clara diferencia entre la tinción de las células vivas y el paraformaldehído. Se observaron células fijadas. Los anticuerpos formaron una tinción uniforme de la membrana cuando las células se fijaron (Figuras 7C, 8C, 8D). Por el contrario, la incubación de las células vivas con estos anticuerpos conduce a la generación de agrupaciones de proteínas, visibles como un patrón de tinción tipo moteado (Figuras 7A, 8A, 8B). Esto muestra que todos los anticuerpos se unen a epítomos nativos tal como se encuentran en la superficie de las células vivas.

f. Determinación de líneas celulares que expresan endógenamente:

Se utilizó un par de cebadores específicos del gen CLD18A2 (SEQ ID NO: 11, 12) en análisis por RT-PCR para rastrear líneas celulares para la expresión de la CLD18A2. Se encontró que las líneas celulares de carcinoma gástrico humano NCI-SNU-16 (ATCC CRL-5974), NUGC-4 (JCRB0834) y KATO-III (ATCC HTB-103) y de células de adenocarcinoma de páncreas humano DAN-G (DSMZ ACC249) desplegaban expresión endógena robusta de la CLD18 (Figura 9). La expresión se confirmó a nivel de proteína mediante tinción con suero policlonal de conejo contra CLD18.

g. Tinción de líneas celulares que expresan endógenamente con anticuerpos específicos de la CLD18 y análisis de inmunofluorescencia:

Las células DAN-G, SNU-16, NUGC-4 y KATO-III se cultivaron en portaobjetos de cámara en condiciones estándar. Las células no se fijaron o alternativamente se fijaron con metanol y se tiñeron con los anticuerpos respectivos. Para los anticuerpos 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, se observó la tinción de la superficie celular como se ejemplifica en la Figura 10, 11 y 12A. Para los anticuerpos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 se ensayó el reconocimiento del epítomo nativo y se observó la tinción de la superficie celular en células no fijadas como se muestra en la Figura 12B. Los subgrupos de anticuerpos mostraron una tinción homogénea de la membrana celular, ya sea preponderantemente en las interfaces célula-célula o en partes libres de la membrana no adyacentes a otras células. Otros anticuerpos tiñeron focos discretos y agregados en la membrana celular que demuestran que los respectivos anticuerpos se unen a epítomos diferentes que incluyen epítomos que están enmascarados por la asociación homotípica o heterotípica de la CLD18 así como epítomos de la CLD18 accesibles en uniones estrechas preformadas.

h. Tinción de líneas celulares que expresan endógenamente mediante citometría de flujo:

La expresión superficial de la CLD18A2 expresada constitutivamente en células vivas KATO-III y NUGC-4 se analizó mediante citometría de flujo. Esto se ejemplifica mediante células KATO-III y NUGC-4 teñidas con anticuerpo monoclonal 61C2 o 163E12, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG conjugado con Alexa647 y fijación de células o alternativamente sin fijación. La unión se evaluó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAarray. La Figura 13 muestra una fuerte unión de 61C2 a al menos un 70.3% de células KATO-III y de 163E12 a CLD18A2 sobre células KATO-III y NUGC-4.

i. Alineación de secuencia de CLD18A1 y CLD18A2 de ratón y humana:

La CLD18A2 humana (NP_001002026) y la CLD18A1 humana (NP_057453) en una comparación de secuencias difieren en las variantes N-terminal y las variantes de CLD18 de ratón (NP_062789 y AAL15636) muestran sitios de alta homología y variación de secuencia entre las moléculas (ver Figura 14).

j. Reactividad de anticuerpos con CLD18A1 murina y CLD18A2 murina, analizada por citometría de flujo:

La unión de los anticuerpos monoclonales identificados a CLD18A2 y CLD18A1 murinas se analizó mediante citometría de flujo. Las células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 murina (SEQ ID NOs: 33, 35) o con un marcador de fluorescencia y CLD18A1 murina (SEQ ID NOs: 36, 37) se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contienen los anticuerpos monoclonales específicos para CLD18 humana 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 y 163E12, respectivamente, durante 30 minutos a 4°C, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG conjugado con Alexa647 y fijación de las células. La unión se evaluó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAarray. La Figura 15 muestra tres perfiles de unión diferentes: 38G5 y 45C1 no se unen a ninguna de las isoformas de la CLD18 murina, 37G11 y 163E12 se unen a CLD18A2 murina, pero no a CLD18A1

murina, y 38H3 se une a CLD18A1 y CLD18A2 murinas. Estos anticuerpos son herramientas valiosas para determinar la posible toxicidad de los anticuerpos monoclonales CLD18 en estudios preclínicos.

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

Se puede usar una combinación de diferentes propiedades descritas en los ejemplos 3b, c, d, e, g, h, y j para categorizar anticuerpos monoclonales en tales clases diferentes.

4. Inmunohistoquímica (IHC)

10 Se usó un anticuerpo específico de epítomo CLD18A2 generado por inmunización con el péptido de SEQ ID NO: 21 para la caracterización inmunohistoquímica de la expresión de la CLD18A2. Las secciones de tejido embebidas en parafina derivadas de un panel completo de tejidos normales y tumorales se usaron para la expresión de proteínas y análisis de localización. No se detectó expresión significativa en ningún otro tejido del órgano normal, excepto el estómago (véase Tab. 2, Figura 16A). Por el contrario, la expresión de la CLD18A2 se verificó por inmunohistoquímica
15 en diferentes cánceres incluyendo cáncer de estómago y cáncer de pulmón (Figura 16B). Curiosamente, la expresión de la proteína CLD18A2 en la mucosa gástrica se restringió a las células diferenciadas terminalmente del epitelio gástrico en las regiones de base y fosa. Por el contrario, las células en la región del cuello de la mucosa gástrica, en particular las células madre gástricas en la parte del istmo, que reponen toda la mucosa, no expresan CLD18A2 (figura 16C).

20 Tabla 2: Expresión de la CLD18A2 en tejidos normales y tumorales analizados por IHC

Tipo de tejido	Resultado
Adrenal	-
Vejiga	-
Células sanguíneas	-
Médula ósea	-
Mama	-
Colon	-
Endotelio	-
Esófago	-
Trompa de Falopio	-
Corazón	-
Riñón (glomérulo, túbulo)	-
Hígado	-
Pulmón	-
Nódulo linfático	-
Ovario	-

Tipo de tejido	Resultado
Páncreas	-
Paratiroidea	-
Pituitaria	-
Placenta	-
Próstata	-
Piel	-
Bazo	-
Estómago	+
Músculo estriado	-
Testículos	-
Timo	-
Tiroides	-
Uréter	-
Útero (cérvix, endometrio)	-

El anticuerpo monoclonal 39F11 se usó para estudios específicos de inmunohistoquímica CLD18A2. Como se muestra en la Figura 17A, no se detectó reactividad significativa en todos los tejidos normales analizados excepto el estómago (Figura 17A), mientras que los carcinomas de estómago y carcinomas de pulmón permanecen fuertemente positivos (Figura 17B).

5

Otro grupo de anticuerpos de la invención muestra un patrón de tinción de cáncer específico con unión a cáncer de estómago pero sin reactividad con tejido estomacal normal. Dicho patrón de tinción se muestra en la Figura 18A con el anticuerpo monoclonal 26B5.

Se usó inmunohistoquímica para el análisis de especificidad de 175D10 (figura 18B), 43A11 (figura 18C), 163E12 (figura 18D) y 45C1 (figura 18E) en secciones derivadas de líneas celulares tumorales HEK293: líneas celulares tumorales HEK293 que de manera estable expresan CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2) o CLD18A1 (HEK293-CLD18A1) o se transfectan con un plásmido de control de la expresión que contiene solo el gen de resistencia a antibióticos para selección (HEK293-mock), fueron xenoinjertadas en ratones para formar tumores sólidos. No se detectó expresión en tumores de xenoinjerto HEK293 transfectados de manera simulada. Por el contrario, se observó tinción fuerte y homogénea de membrana en tumores de xenoinjerto HEK293-CLD18A2 y en muestras de carcinoma de estómago.

10

15

5. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

a. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto 1 medido por citometría de flujo:

El plasma para la lisis por complemento se preparó extrayendo sangre de voluntarios sanos, en tubos Vacutainer S-Monovette-EDTA (Sarstedt, Nürnbergrecht, Alemania) que luego se centrifugaron a 600 g durante 20 minutos. El plasma se cosechó y almacenó a -20°C.

20

En un primer conjunto de experimentos, los sobrenadantes de hibridoma se analizaron en cuanto a su capacidad para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células HEK293 que expresan de manera estable

CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2). Las células se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10, 24H5 o 26D12, respectivamente, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación (5 minutos a 450 g), se separó el sobrenadante y se añadió 20% de plasma humano en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. A continuación, la lisis celular se determinó en FACS usando el método de tinción con yoduro de propidio (PI). Se añadió PI a una concentración final de 2.5 µg/ml. Para la citometría de flujo, se usó un citómetro de flujo BD FACSArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recolectaron al menos 10000 eventos para el análisis con residuos celulares excluidos mediante el ajuste del umbral de dispersión lateral directa (FCS). El porcentaje de células lisadas (células PI-positivo) se muestra en la Figura 19. Los anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10 y 26D12 indujeron lisis 33.5%, 38.2% y 39.2%, respectivamente de las células HEK293-CLD18A2, mientras que la CDC mediada por 24H5 fue sólo del 19.3%.

b. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto 1:

En un segundo conjunto de experimentos, se analizó la especificidad de los anticuerpos monoclonales para inducir CDC en células que expresan CLD18A2. Por lo tanto, un conjunto de anticuerpos que se unen ya sea específicamente para CLD18A2 humana o también la unión a CLD18A1 humana se ensayó para inducción por CDC frente a células CHO transfectadas de forma estable con CLD18A2 humana (CHO-CLD18A2) o CLD18A1 humana (CHO-CLD18A1). Las células CHO-CLD18A2 y CHO-CLD18A1 se sembraron 24 h antes del ensayo con una densidad de 3×10^4 /pozo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. Al día siguiente, se eliminó el medio de crecimiento y las células se incubaron por triplicado con sobrenadantes de hibridoma ajustados a una concentración de 10 µg/ml que contenía anticuerpos monoclonales 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12 y 61C2, respectivamente. Las células de control se incubaron con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contenía 0.2% de saponina para la determinación de la lisis de fondo y la lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante y se añadió 20% de plasma humano en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. Luego, los sobrenadantes se reemplazaron por PBS que contenía 2.5 µg/ml de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia después de la excitación a 520 nm se midió usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera: % de lisis específica = (muestra de fluorescencia - fondo de fluorescencia)/(lisis de fluorescencia máxima - fondo de fluorescencia) x 100. La Figura 20 muestra que los anticuerpos monoclonales 26D12, 28D10, 37H8, 38H3 y 39F11 median altamente, el anticuerpo monoclonal 38G5 media en término medio, los anticuerpos monoclonales 41C6 y 61C2 median en término bajo, y los anticuerpos monoclonales 24H5, 37G11, 42E12, 43A11, 44E10 y 47D12 no median CDC contra las células CHO-CLD18A2. Por el contrario, ninguno de los anticuerpos es capaz de inducir CDC contra células CHO-CLD18A1, aunque 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 41C6, 47D12 y 61C2 también se unen a CLD18A1 según se determina por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

c. Valoración de anticuerpos monoclonales y CDC usando anticuerpos monoclonales de Conjunto 1:

Para medir la capacidad de los anticuerpos anti-CLD18 para inducir CDC a bajas concentraciones, se realizó un experimento en donde se titularon tres anticuerpos diferentes. Las células CHO-CLD18A2 que crecen en placas de microtitulación se incubaron con un intervalo de concentración de 75B8 (100, 30, 10, 3 y 1 µg/ml), 37H8 (10, 3,3 y 1 µg/ml) y 28D10 (10, 1 y 0.1) µg/ml, respectivamente, durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. Antes del análisis utilizando un Tecan Safire, los sobrenadantes se reemplazaron por PBS que contenía 2.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las Figuras 21A-C muestran el porcentaje de lisis específica en función de la concentración de anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 75B8 induce la lisis de 31.0% de células CHO-CLD18A2 a 10 µg/ml, y cae al 6.2% a 1 µg/ml (figura 21A), mientras que los anticuerpos monoclonales 28D10 y 37H8 todavía inducen una lisis específica del 39% y 26.5% a 1 µg/ml (Fig. 21B, C), respectivamente.

d. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto 2 medido por citometría de flujo:

Se preparó suero para la lisis del complemento extrayendo sangre de voluntarios sanos, en tubos Vacutainer Serum-Monovette (Sarstedt, Nürmbrecht, Alemania) que se centrifugaron luego a 600 g durante 20 minutos. El suero fue recolectado y almacenado a -20°C. El suero control se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos antes del almacenamiento.

Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma en cuanto a su capacidad para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humana. Las células se incubaron con sobrenadantes de hibridoma crudos o purificados que contenían anticuerpos monoclonales 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, respectivamente, durante 30 minutos a 37°C. Se añadió suero humano al 20% en RPMI a las células y se incubó durante otros 30 minutos a 37°C. A continuación, la lisis celular se determinó en FACS usando el método de tinción de yoduro de propidio (PI). Se añadió PI a una concentración final de 2.5 µg/ml. Para la citometría de flujo se utilizó un citómetro de flujo BD FACSArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recolectaron al menos 10000 eventos para el análisis con desechos celulares excluidos mediante el ajuste del umbral de dispersión lateral directa (FSC/SSC). La lisis específica se calculó mediante la siguiente fórmula: lisis específica = (% de células

PI positivas en muestra -% de células PI positivas en muestra con suero inactivado por calor). Se observó una lisis sólida mediada por CDC en particular para 163E12.

6. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

5 Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma por su capacidad de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) contra células HEK293 que expresan de manera estable CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2) o CLD18A1 humana (HEK293-CLD18A1).

10 a. Enriquecimiento de células mononucleares de sangre periférica humana: la sangre humana de donantes sanos se diluyó dos veces en regulador fosfato (PBS) y las células sanguíneas se dispusieron en capas sobre Ficoll (medio de separación de linfocitos 1077 g/ml, PAA Laboratories, catálogo no. J15-004). Las células mononucleares de sangre periférica (MNCs) se recolectaron de la interfase, se lavaron y resuspendieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de suero de ternera fetal inactivado por calor, L-glutamina 2 mM.

15 b. Configuración de ADCC: las células diana se marcaron con un ligando potenciador de fluorescencia (BADTA, kit de ensayo de citotoxicidad Perkin Elmer DELFIA EuTDA Cytotoxicity Reagents, catálogo no. AD0116) durante 30 minutos. Después del lavado extenso en RPMI-10 complementado con probenecida 10 mM (Sigma, catálogo no. P8761), HEPES 10-20 mM y suero de ternera fetal inactivado por calor al 10%, las células se ajustaron a 1×10^5 células/ml. Se añadieron células diana etiquetadas, células efectoras (CMN) y sobrenadantes que contienen anticuerpos monoclonales ajustados a una concentración de 10 µg/ml a placas de microtitulación de fondo redondo. Para las células efectoras aisladas, se utilizó una relación efector a objetivo (E:T) de 100:1 (datos no mostrados para 20 la liberación del ligando de fluorescencia a partir de los duplicados en los recuentos de europio en un fluorómetro de resolución temporal. El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó usando la siguiente fórmula: % de lisis específica = (recuentos de liberación experimental - recuentos de liberación espontánea)/(recuentos de liberación máxima - recuentos de liberación espontánea) x 100, con liberación máxima del ligando de fluorescencia determinada mediante la adición de Triton X-100 (0.25% de concentración final) a las células diana, y la liberación espontánea se midió en 25 ausencia de anticuerpos y células efectoras. La Figura 22 muestra que los anticuerpos monoclonales 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2 median ADCC contra células HEK293-CLD18A2. Por el contrario, estos anticuerpos no inducen citotoxicidad significativa o solo de bajo nivel en las dianas CLD18A1 que demuestran una ADCC específica de la CLD18A2 (Figura 23).

7. Inhibición de la proliferación

30 Se analizaron los anticuerpos monoclonales murinos purificados por su capacidad para inhibir el crecimiento celular de células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humana.

Se cultivaron 1×10^4 células diana que expresan endógenamente CLD18A2 (KATO-III) en presencia de aproximadamente 10 µg de anticuerpos monoclonales.

35 El kit de proliferación celular DELFIA (Perkin-Elmer, catálogo no. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta usando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, las células se fijan y se desnaturaliza el ADN con la solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se agrega inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor 40 DELFIA. La fluorescencia medida, que utiliza la fluorometría resuelta en el tiempo en la detección, es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

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

45 8. Desempeño en modelos terapéuticos de xenoinjerto de ratón

Se estudió el potencial terapéutico de los anticuerpos monoclonales identificados que se unen específicamente a CLD18A2 en modelos de xenoinjerto terapéuticos.

a. Tratamiento temprano de tumores que expresan altamente CLD18A2 en ratones

50 Se inocularon ratones SCID por vía subcutánea con 1×10^7 células HEK293 que expresaban de manera estable altos niveles de la CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2). Los niveles de expresión de la CLD18A2 humana en células HEK293-CLD18A2 fueron comparables con los niveles de expresión en cánceres gástricos primarios de pacientes. Cada grupo de tratamiento experimental comprendía 10 ratones (número de ratones por grupo n=10). La terapia de los ratones comenzó 3 días después de la inoculación del tumor. Se inyectaron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificados que representan anticuerpos monoclonales murinos 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 39F11, 42E12, 43A11, 38H3 o 61C2, una vez por semana durante 4 semanas por vía intravenosa. Alternativamente, se 55 administraron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían anticuerpos monoclonales murinos

45C1, 125E1, 163E12, 166E2 o 175D10 dos veces por semana durante 6 semanas alternando la inyección intravenosa e intraperitoneal. El crecimiento tumoral de los ratones tratados se controló dos veces por semana (volumen tumoral = longitud x ancho x ancho dividido por 2 en mm³). Los ratones se sacrificaron si el tumor alcanzaba un volumen de 500 mm³ o en caso de morbilidad grave. La Figura 24 ejemplifica la inhibición robusta del crecimiento de células tumorales HEK293-CLD18A2 por anticuerpos de la invención. Las Figura 25A y 25B muestran la prolongación de la supervivencia mediante el tratamiento con anticuerpos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento precoz utilizando células HEK293-CLD18A2.

b. Tratamiento de inicio tardío de tumores avanzados que expresan altamente CLD18A2 en ratones

El mismo modelo de xenoinjerto tumoral basado en células HEK293-CLD18A2 se diseñó como un protocolo de inicio tardío de terapia en oposición al tratamiento precoz descrito anteriormente. El día 27 después de la inoculación de células tumorales, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de prueba que comprendían cada uno 5-6 ratones y se inició la terapia con 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían anticuerpos monoclonales murinos 43A11, 163E12 y 175D10, respectivamente. Los anticuerpos se administraron dos veces por semana durante 6 semanas alternando la inyección intravenosa e intraperitoneal. También en este modelo, se demostró que los anticuerpos de la invención inhiben el crecimiento tumoral. Para varios anticuerpos esto dio como resultado la prolongación de la supervivencia (Figura 26).

c. Tratamiento temprano de tumores que expresan bajos niveles de la CLD18A2

Se inocularon ratones SCID por vía subcutánea con 2 x 10⁵ células de la línea celular tumoral DAN-G, una línea celular de adenocarcinoma pancreático humano infiltrante que expresa constitutivamente la proteína CLD18A2 a bajo nivel. El tratamiento de ratones (10 por grupo) se inició 3 días después del injerto tumoral: se administraron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificados que contenían anticuerpos monoclonales murinos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 o 175D10, dos veces por semana durante 6 semanas alternando inyección intravenosa e intraperitoneal. Debido al crecimiento tumoral agresivo y rápido de la línea celular tumoral pancreática DAN-G, los ratones *in vivo* desarrollaron caquexia tumoral y murieron en pocos días. Aunque, como consecuencia, la ventana para medir los efectos terapéuticos era estrecha, también se observó la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia prolongada mediada por los anticuerpos de la invención en este modelo (Figuras 27A y 27B).

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

Se usó un par de cebadores específicos de la CLD18A2 murina (s: CTA CCA AGG GCT ATG GCG TTC, como: GCA CCG AAG GTG TAC CTG GTC) en los análisis por RT-PCR para amplificar ADNc derivado de un panel completo de tejidos de ratón normales (véase Figura 28).

La expresión de la CLD18A2 murina no era detectable en ninguno de los tejidos normales probados, excepto el estómago (véase la Figura 28). Además, se usó un anticuerpo específico de la CLD18A2, que reacciona de forma cruzada con CLD18A2 humana y de ratón, para el análisis inmunohistoquímico de la expresión de la CLD18A2 en un panel grande de tejidos de ratón normales (véase la Tabla 3). Excepto por el tejido gástrico normal, todos los tejidos normales probados no muestran expresión de la CLD18A2. Como se observó para la CLD18A2 humana, también se encontró para el homólogo de ratón que mientras que las células de epitelio superficial y criptas más profundas expresan CLD18A2 en su superficie celular, la región central del cuello es negativa para CLD18A2 (ver Figura 29 A-C). En resumen, la distribución tisular de la CLD18A2 parece ser idéntica en hombres y ratones.

Tabla 3: Expresión de la CLD18 en tejidos normales murinos analizados por inmunohistoquímica

Tejido	Expresión de CLD18
Cerebelo	-
Cerebro	-
Colon	-
Esófago	-
Corazón	-
Riñón	-
Hígado	-

Tejido	Expresión de CLD18
Pulmón	-
Nódulo linfático	-
Ovario	-
páncreas	-
Músculo esquelético	-
Bazo	-
Estómago	+
Timo	-
Vejiga	-

Además investigamos los efectos secundarios potenciales mediados por los anticuerpos 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 en ratones. Todos estos anticuerpos habían mostrado previamente, mediante análisis FACS, reaccionar con la CLD18A2 murina así como con la proteína humana.

- 5 Tampoco se observaron efectos secundarios visibles en ratones durante y después del tratamiento con estos anticuerpos, ni se observaron correlaciones histomorfológicas de toxicidad en la mucosa gástrica de ratones tratados con anticuerpos en comparación con ratones no tratados (tratados con PBS) (ver Figura 30).

e. Tratamiento temprano de tumores que expresan altamente CLD18A2 en ratones con anticuerpos monoclonales quiméricos

- 10 De forma similar al ejemplo 8a pero usando anticuerpos monoclonales quiméricos, se evaluó el tratamiento temprano de tumores que expresan altamente CLD18A2 en ratones con anticuerpos de la invención. En resumen, los ratones SCID se inocularon por vía subcutánea con 1×10^7 células HEK293 que expresaban de manera estable altos niveles de la CLD18A2 humana (HEK293-CLD18A2). Cada grupo de tratamiento experimental comprendió 10 ratones. La
 15 terapia de los ratones comenzó 3 días después de la inoculación del tumor. Se administraron 200 µg de sobrenadantes de cultivo celular purificados de células HEK293T transfectadas transitoriamente para producir anticuerpos monoclonales quiméricos ch-163E12 o ch-175D10 (véase el ejemplo 9, a continuación) dos veces por semana durante
 20 6 semanas alternando la inyección intravenosa e intraperitoneal. Podría observarse una fuerte inhibición del crecimiento de células tumorales HEK293-CLD18A2 por los anticuerpos quiméricos de la invención. La Figura 34 muestra la prolongación de la supervivencia mediante el tratamiento con anticuerpos quiméricos de la invención en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano usando células HEK293-CLD18A2.

f. Tratamiento de inicio tardío de tumores que expresan altamente CLD18A2 avanzado en ratones con anticuerpos monoclonales quiméricos

- El mismo modelo de xenoinjerto tumoral basado en células HEK293-CLD18A2 como se describió anteriormente se
 25 diseñó como un protocolo de inicio tardío de terapia en oposición al tratamiento temprano descrito anteriormente. El día 8 después de la inoculación de células tumorales, los ratones se distribuyeron aleatoriamente en grupos de prueba que comprendían cada uno 9 ratones y se inició la terapia con 200 µg de sobrenadantes de cultivo celular purificados de células HEK293T transfectadas transitoriamente para producir anticuerpos monoclonales quiméricos ch-163E12 o
 30 ch-175D10 (véase ejemplo 9, abajo). Los anticuerpos se administraron dos veces por semana durante 6 semanas alternando la inyección intravenosa e intraperitoneal. También en este modelo se demostró que los anticuerpos quiméricos de la invención inhiben el crecimiento tumoral. Para varios anticuerpos quiméricos esto dio como resultado la prolongación de la supervivencia (Figura 35).

9. Quimerización de anticuerpos

a. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/humanos

Se preparó ARN total y, posteriormente, ADNc de cadena sencilla a partir de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) y de tejido de bazo humano, por métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, usando el kit RNeasy Midi (Qiagen) y transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen).

5 La región constante de la cadena liviana kappa humana se amplificó a partir de ADNc de PBMC mediante PCR. El oligómero en sentido (SEQ ID NO: 38) añadió un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' de la región constante y cambió la secuencia de ácido nucleico original 5'-CGAACT-3' que codifica los primeros dos aminoácidos (Arg-Thr) de la región constante en 5'-CGTACG-3', generando un sitio de restricción BsiWI sin cambiar la secuencia de aminoácidos. El oligómero antisentido (SEQ ID NO: 39) incluía un codón de parada y se añadió un sitio de restricción NotI en el extremo 3' de la región constante amplificada. El producto de PCR, así como un vector de expresión estándar (por ejemplo, pcDNA3.1(+), Invitrogen) se incubaron secuencialmente con enzimas de restricción BamHI y NotI. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal de ternera para evitar la recirculación. La región constante finalmente se ligó en el vector, de modo que cualquier fusión venidera de una región variable frente a la región constante ahora es posible a través de un sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') del sitio de clonación múltiple de vector residual y a través del sitio de restricción BsiWI (5'-CGTACG-3') generado con el producto de PCR. 10 La secuencia de la región constante de cadena liviana kappa humana insertada en el vector se enumera como SEQ ID NO: 40, la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana se enumera como SEQ ID NO: 41.

La región constante de la cadena pesada de gamma-1 humana se amplificó a partir de ADNc de bazo mediante PCR. El oligómero en sentido 5' fosforilado (SEQ ID NO: 42) se colocó sobre el sitio de restricción Apal de origen natural, se localizó a 11 nucleótidos corriente abajo del comienzo de la región constante, y se añadió un sitio de restricción HindIII en el extremo 5' de la parte amplificada de la región constante. El oligómero antisentido fosforilado en 5' (SEQ ID NO: 43) incluía un codón de parada y agregaba un sitio de restricción NotI en el extremo 3' de la región constante así amplificada. El producto de PCR así generado fue de extremos romos y fosforilado en 5'. Se verificó que la región constante gamma amplificada era de la subclase IgG1 mediante PCR con un oligómero antisentido discriminante (SEQ ID NO: 44) y mediante secuenciación. Se incubó un vector de expresión estándar (por ejemplo pcDNA3.1(+)/Hygro, Invitrogen) con una resistencia a antibióticos diferente (por ejemplo, higromicina) que la del vector utilizado para la expresión de la cadena liviana (por ejemplo neomicina) con enzima de restricción PmeI para eliminar completamente el sitio de clonación múltiple dejando extremos romos. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal de ternera para evitar la recirculación. La región constante finalmente se ligó al vector, de modo que ahora es posible cualquier fusión venidera de una región variable frente a la región constante a través del sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') y a través del sitio de restricción Apal (5'-GGGCC-3'), ambos generados con el producto de PCR. La orientación correcta de la región constante en el vector, es decir, adecuada para el promotor anterior del vector, se verificó mediante secuenciación. Debido a la posición del sitio de restricción Apal, cualquier amplificación de una región variable para este fin debe incluir los primeros 11 nucleótidos de la secuencia de la región constante gamma-1 humana además de la secuencia del sitio Apal. La secuencia de la región constante de cadena pesada de gamma-1 humana así amplificada insertada en el vector se enumera como SEQ ID NO: 45, la secuencia de aminoácidos de la región constante de gamma-1 humana así expresada se enumera como SEQ ID NO: 46. 20 25 30 35

Tabla 4: Líneas celulares de hibridoma de ratón utilizadas para la clonación de anticuerpos

	clon	mAb	Isotipo	región variable	par de oligómeros en PCR	anticuerpo quimerizado
cadena pesada	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:55, 132	SEQ ID NO:70, 71	SEQ ID NO:100, 115
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:56, 133	SEQ ID NO:72, 73	SEQ ID NO:101, 116
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:57, 134	SEQ ID NO:74, 75	SEQ ID NO:102, 117
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:59, 136	SEQ ID NO:78, 79	SEQ ID NO:104, 119
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:58, 135	SEQ ID NO:76, 77	SEQ ID NO:103, 118
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:60, 137	SEQ ID NO: 80,81	SEQ ID NO:105, 120

ES 2 675 375 T3

	clon	mAb	Isotipo	región variable	par de oligómeros en PCR	anticuerpo quimerizado
cadena liviana	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:62, 139	SEQ ID NO:84, 85	SEQ ID NO:107, 122
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:61, 138	SEQ ID NO:82, 83	SEQ ID NO:106, 121
	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:63, 140	SEQ ID NO:86, 87	SEQ ID NO:108, 123
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:66, 143	SEQ ID NO:92, 93	SEQ ID NO:111, 126
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:65, 142	SEQ ID NO:90, 91	SEQ ID NO:110, 125
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:64, 141	SEQ ID NO:88, 89	SEQ ID NO:109, 124
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:67, 144	SEQ ID NO:94, 95	SEQ ID NO:112, 127
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:68, 145	SEQ ID NO:96, 97	SEQ ID NO:113, 128
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:69, 146	SEQ ID NO:98, 99	SEQ ID NO:114, 129

Correspondientemente a sus homólogos murinos, los anticuerpos monoclonales quiméricos se nombraron añadiendo el prefijo "ch", por ejemplo ch-43A11, ch-163E12, ch-125E1, ch-166E2, ch-175D10, ch-45C1.

5 La amplificación de las regiones variables murinas de cadenas livianas y pesadas se llevó a cabo de acuerdo con el método de "PCR por etapas" descrito en Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6). Para esto, se preparó ARN total a partir de líneas celulares de hibridoma monoclonal (véase la Tabla 4) mediante métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo con el uso de RNeasy Mini Kit (Qiagen). El ADNc de cadena sencilla se preparó de acuerdo con el método de "cambio de plantilla" también descrito en Matz et al. (Nucleic Acids Research, 1999, Vol. 27, No. 6, 1558). Además de un oligómero (dT) 30 (SEQ ID NO: 47), incluía un oligómero híbrido de ADN/ARN (SEQ ID NO: 48) que sirve como un adaptador 5' para la conmutación de plantilla durante la polimerización de la cadena de ADNc. En este oligómero adaptador, los últimos tres nucleótidos fueron ribo-, en lugar de desoxirribonucleótidos. La posterior "PCR paso a paso" utilizó un oligómero antisentido dirigido a la región constante de la cadena kappa de ratón o a la región constante de las subclases 1, 2a o 3 de las cadenas gamma (SEQ ID NO: 49 a 52, respectivamente). La subclase IgG del anticuerpo monoclonal murino producido por las líneas celulares de hibridoma se analizó previamente inmunológicamente con IsoStrip (véase el Ejemplo 1), y el oligómero antisentido apropiado se eligió en consecuencia (véase la Tabla 4). Una mezcla de cebador sirvió como el oligómero en sentido en la "PCR por etapas", que comprende los dos oligómeros enumerados en SEQ ID NO: 53 y 54. Algunas líneas celulares de hibridoma expresaron más de una cadena pesada o ligera (además de las cadenas expresadas por la línea celular de mieloma usada para la generación de hibridomas). La Tabla 4 resume las SEQ ID NOs de las regiones variables clonadas y secuenciadas de las cadenas de anticuerpos murinas (SEQ ID NO: 55 a 69 y SEQ ID NO: 132 a 146) y de las cadenas de anticuerpos quiméricos de longitud completa clonadas y secuenciadas (SEQ ID NO: 100 a 129).

25 Las regiones variables murinas identificadas se amplificaron después mediante PCR omitiendo la región constante de ratón 5' y la región 3', añadiendo sitios de restricción a los extremos que permitieron la subclonación en los vectores de expresión preparados que portan las regiones constantes humanas. Además, los oligómeros sentido proporcionaron una secuencia consenso de Kozak (5'-GCCGCCACC-3' o 5'-AGCCACC-3') y los oligómeros antisentido para las regiones variables de la cadena pesada incluyeron los primeros 11 nucleótidos de la región constante humana gamma-1 además del sitio de restricción Apal (ver Tab. 4, SEQ ID NO: 70 a 99). Las regiones

variables de la cadena liviana Kappa se clonaron utilizando las enzimas de restricción HindIII y BsiWI, las regiones variables de la cadena pesada gamma exigieron las enzimas de restricción HindIII y ApaI. La región variable de cadena gamma pesada del anticuerpo monoclonal 45C1 contenía un sitio de restricción HindIII interno; aquí, en su lugar, se usó la enzima BsaI compatible (véase la SEQ ID NO: 80). Las SEQ ID NO: 100 a 114 muestran las secuencias de ácidos nucleicos de los anticuerpos quiméricos resultantes (ver Tab. 4). Las SEQ ID NO: 115 a 129 muestran las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos quimerizados expresados en consecuencia (véase la Tabla 4).

b. Generación y producción de anticuerpos quiméricos contra CLD18

Se generaron líneas celulares de mamífero que producen anticuerpos quiméricos con especificidad CLD18. Las líneas celulares derivadas de células HEK293T (ATCC CRL-11268). Un día antes de la transfección, se sembraron 2.5×10^7 células en una placa de cultivo de tejidos de 14.5 cm y se cultivaron en 20 ml de medio completo, o alternativamente se sembraron 1×10^7 células en una placa de cultivo de tejido de 10 cm y se cultivaron en 10 ml de medio completo, o alternativamente, se sembraron 0.6×10^6 células en un pozo de una placa de tejido de 12 pozos y se cultivaron en 2-3 ml de medio completo (medio completo: medio DMEM: F12 suplementado con FBS al 10% sin antibióticos). La densidad celular recomendada en el momento de la transfección debe ser del 90% de confluencia. Inmediatamente antes de la transfección, el medio se reemplazó por medio nuevo. Las células HEK293T se transfectaron con reactivos de transfección, por ejemplo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-019) o alternativamente polietilenimina (Sigma-Aldrich, 408727). Ejemplificado para la transfección de células HEK293T se usó una cantidad total de ADN de 110 μg o 296 μg para una placa de tejido de 14.5 cm, y la relación de agente de transfección a ADN fue de 1:2.5 y 1:12 para Lipofectamine 2000 y PEI, respectivamente. 24 h después de que el medio de transfección se reemplazó por un medio adecuado para GMP, por ejemplo X-Vivo 15 (Cambrex) o un medio químico definido como Pro293a (Cambrex) sin suero. Las células HEK293T transfectadas que producen anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLD18 se cultivaron durante 96 h adicionales. Los sobrenadantes brutos se recolectaron, se filtraron en condiciones estériles y se purificaron con proteína A-sefarosa. La concentración de anticuerpo se determinó mediante ensayo BCA y se verificó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción con Coomassie.

c. Características de unión de anticuerpos monoclonales quiméricos

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos clonados y generados para CLD18A2 se analizó mediante citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 3. Las células HEK293 que expresan de manera estable CLD18A2 (HEK293-CLD18A2) y células HEK293 humanas que expresan CLD18A1 humana (SEQ ID NOs: 7, 8) (HEK293-CLD18A1) se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadantes de cultivo de células HEK293T purificados que contienen anticuerpos monoclonales quiméricos, seguido de incubación con anticuerpo secundario anti Fc γ IgG de cabra anti-FG humano conjugado con APC y contrateñido con PI. La unión se evaluó mediante citometría de flujo usando un BD FACSAArray.

De forma similar, las líneas de células tumorales humanas que expresan CLD18A2 endógenamente, por ejemplo células KATO-III y NUGC-4, se analizaron mediante citometría de flujo.

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

d. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

Se preparó suero para la lisis por complemento extrayendo sangre de voluntarios sanos en tubos Vacutainer Serum-Monovette (Sarstedt, Nürmbrecht, Alemania) que se centrifugaron luego a 600 g durante 20 minutos. El suero fue recolectado y almacenado a -20°C. El suero control se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos antes del almacenamiento.

Se analizaron los anticuerpos quiméricos purificados con proteína A-Sepharose de esta invención por su capacidad para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humana, así como células CHO-CLD18A2 transfectadas de forma estable. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10, respectivamente, en una concentración final de 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ durante 30 minutos a 37°C. Se añadió suero humano al 20% en RPMI a las células y se incubó durante otros 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células muertas y vivas se discriminaron mediante tinción de PI en una concentración final de 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y el porcentaje de lisis celular mediada por anticuerpo se determinó por citometría de flujo. Para el análisis por citometría de flujo se usó un citómetro de flujo BD FACSAArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recolectaron al menos 10000 eventos para el análisis con desechos celulares excluidos mediante el ajuste del umbral de dispersión lateral directa (FSC/SSC). La lisis específica se calculó mediante la siguiente fórmula: lisis específica = (% de células PI positivas en muestra - % de células PI positivas en muestra con suero inactivado por calor). La lisis específica mediada por CDC se mostró para varios anticuerpos. Los tres anticuerpos mediaron CDC robustos en células CHO-CLD18A2 (Figura 32). En las células KATO-III, los anticuerpos ch-163E12 y ch-175D10 fueron inductores de CDC fuertes.

e. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC)

Los anticuerpos quiméricos purificados por FPLC de la invención se analizaron por su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humana.

- 5 La sangre humana de donantes sanos se diluyó dos veces en regulador fosfato (PBS) y las células sanguíneas se dispusieron en capas sobre Ficoll (1077 g/ml, Pharmacia). Después de la centrifugación, se recolectaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo X-Vivo-15 suplementado con 5% de suero humano inactivado por calor.

15 h antes del ensayo, las células KATO-III se transfectaron con luciferasa y se sembraron a 5×10^4 células/pozo en una microplaca blanca.

- 10 Para el ensayo, se añadieron células efectoras (PBMC, preparadas como se describió anteriormente) a una relación de efector a objetivo (E:T) de 20:1 y anticuerpos quiméricos purificados por FPLC y se incubaron durante 2-3 h a 37°C, 5% de CO₂. La concentración final del anticuerpo en el pozo fue de 50 µg/ml. Después de 2-3 h de preincubación, se añadió lucifer amarillo (BD Biosciences, San Jose USA) a 1 mg/ml. La luminiscencia resultante de la oxidación de Lucifer amarilla por la luciferasa de células viables se midió continuamente durante hasta 6 h usando un lector de microplacas (Infinite200, Tecan, Suiza). El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó usando la siguiente fórmula:
- 15 % de lisis específica = $100 - ((\text{recuentos de luminiscencia de muestra} - \text{recuentos de luminiscencia espontánea}) / (\text{recuentos de luminiscencia máxima} - \text{recuentos de luminiscencia espontánea}) \times 100)$, con la luminiscencia espontánea determinada mediante la adición de Triton X -100 (0.2% de concentración final) y la señal máxima medida en ausencia de anticuerpos.
- 20 Usando este ensayo, se demostró que los anticuerpos monoclonales ch-163E12 y ch-175D10 median una fuerte ADCC en células KATO-III (figura 33).

f. Inhibición de la proliferación

Los anticuerpos quiméricos purificados por FPLC de la invención se analizaron en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento celular de células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humana.

- 25 Las células diana (KATO-III) se cultivaron en presencia de anticuerpos quiméricos respectivos (véase la inhibición de la proliferación de anticuerpos murinos, Ejemplo 7). Se ha demostrado que los anticuerpos quiméricos purificados por FPLC ch-163E12 y ch-166E2 inhiben la proliferación celular.

10. Selección de anticuerpos como candidatos clínicos principales

- 30 Los candidatos clínicos ideales pueden cubrir una amplia gama de aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (véase también la sección IV - Usos y métodos de la invención). De acuerdo con la invención, se proporcionan anticuerpos dirigidos contra CLD18-A2. Se muestra que los anticuerpos proporcionados de acuerdo con la invención ofrecen un amplio espectro de propiedades con respecto a la especificidad, capacidad para inducir CDC y ADCC e inhibir la proliferación de células que expresan CLD18, en particular células tumorales. Además, se ha demostrado que la quimerización de anticuerpos puede conducir a la adquisición de funciones efectoras adicionales dependientes de Fc no presentes en la molécula murina parental. Por ejemplo, se muestra aquí que el anticuerpo 175D10 con IgG1 murina no induce citotoxicidad dependiente del complemento (véase el Ejemplo 5), mientras que ch-175D10 con IgG1 humana induce la lisis específica de células tumorales que expresan CLD18 constitutivamente (véanse Tab. 5 y Tab. 6)
- 35

- 40 Los anticuerpos proporcionados de acuerdo con la presente invención se pueden categorizar en distintas clases de acuerdo con sus propiedades de unión y su capacidad para mediar las funciones efectoras en las células que expresan CLD18. A partir de los anticuerpos proporcionados de acuerdo con la presente invención, los candidatos clínicos principales pueden seleccionarse basándose en sus características funcionales. Una visión general de las propiedades para anticuerpos murinos y quiméricos seleccionados de la invención se da en la Tab. 5 y Tab. 6, respectivamente.

Los candidatos clínicos principales de la invención pueden tener una o más de las siguientes propiedades:

- 45 a) unión a CLD18A2 humana pero no a CLD18A1 humana (por ejemplo 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-43A11, CH-45C1, CH-125E1, CH-163E12, CH-166E2 y CH- 175D10). Para ejemplos, véanse las Figuras 6A y 6B.
- b) unión a CLD18A2 de ratón pero no a CLD18A1 de ratón (por ejemplo, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos, véanse las Figuras 15A y 15B.
- 50 c) unión a CLD18 naturalmente expresada por células tumorales (por ejemplo, 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-45C1, ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10) Para ejemplos, ver figura 13
- d) unión a CLD18 en zonas de contacto intercelular (por ejemplo, 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos, véanse las Figuras 12A y 12B.

e) mediar la muerte de células inducida por CDC, que expresa CLD18 (por ejemplo, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-163E12 y ch-175D10). Para ejemplos, véase la Figura 32.

f) mediar la destrucción inducida por ADCC de células que expresan CLD18 (por ejemplo, ch-163E12 y ch-175D10). Para ejemplos, véase la Figura 33.

5 g) inhibir la proliferación de células que expresan CLD18 (por ejemplo, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-163E12 y ch-166E2).

h) inhibir el crecimiento tumoral en modelos de xenoinjertos con células que expresan CLD18 (por ejemplo, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos, vea la figura 24.

10 i) prolongar la supervivencia en modelos de xenoinjertos con células que expresan CLD18 (por ejemplo, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Para ejemplos, vea la figura 25B.

Visión general de ejemplo de las propiedades para la selección del candidato principal

Tabla 5: Anticuerpos murinos

Anticuerpo	unión de la CLD18A2 humana pero no A1	unión de CLD18A2 de murino pero no A1	unión de la CLD18 en células tumorales que se expresan naturalmente	unión a CLD18 en zonas de contacto	mediación CDC en células que expresan CLD18	inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18	inhibición del crecimiento tumoral en xenoinjerto que expresa CLD18	Prolongación de la supervivencia en xenoinjerto que expresa CLD18
45C1	+	-	+	+	(+)	+	(+)	(+)
125E1	+	+	+	+	(+)	+	+	+
163E12	+	+	+	+	+	+	+	+
175D10	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+

leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes configuraciones.

Tabla 6: Anticuerpos quiméricos

Anticuerpo	unión de la CLD18A2 humana pero no A1	unión de la CLD18 en células tumorales que se expresan naturalmente	Mediación de CDC en células que expresan CLD18	Mediación de ADCC en células que expresan CLD18	Inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18
ch-45C1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-125E1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-163E12	+	+	+	+	+
ch-175D10	+	+	+	+	n.d.

leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes configuraciones, .n.d. no hecho

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

5 En resumen, para el mapeo de epítomos, se pueden crear barridos peptídicos mediante péptidos solapantes sintéticos (preparados por SPOT-Synthesis) derivados de la secuencia de aminoácidos del antígeno. La membrana de barrido peptídico puede lavarse con TBS, bloquearse con leche al 10%/Tween 20-TBS e incubarse con anticuerpos de la invención conjugados con peroxidasa durante la noche a 4°C diluidos en leche al 5%/Tween 20-TBS, seguido de lavado con Tween20-TBS y TBS, desarrollado con, por ejemplo, ECL Lumi-Light (Roche) y detectado mediante un Lumi Imager.

10 a. Análisis del epítomo molecular

El primer dominio extracelular (ECD1) de la CLD18 humana muestra un alto grado de homología entre ambas isoformas con solo 8 posiciones en la secuencia de aminoácidos que representan la diferencia (véase la Figura 14).

15 Se seleccionaron anticuerpos monoclonales que reconocen selectivamente solo la isoforma CLD18A2 específica del estómago (véase el ejemplo 1). Para determinar los aminoácidos críticos de aquellos que difieren en ambas isoformas, se crearon sustituciones de aminoácidos en las proteínas CLD18 mediante el intercambio de aminoácidos en una isoforma con los encontrados en las posiciones correspondientes en la otra isoforma. Específicamente, se generaron ocho variantes, en las que en cada variante uno de los ocho aminoácidos en CLD18A2 ECD1 que difería de la secuencia de aminoácidos de la CLD18A1 se reemplazó por el aminoácido encontrado en la posición correspondiente en CLD18A1. Se generaron tres variantes de la CLD18A2, en las que en cada variante se sustituyeron 2 aminoácidos por los aminoácidos encontrados en las posiciones correspondientes en CLD18A1: el segundo y tercero, el tercero y cuarto, y el cuarto y quinto aminoácidos de esos 8 aminoácidos. Los 11 constructos correspondientes para la otra isoforma CLD18A1 se generaron reemplazando los respectivos aminoácidos en CLD18A1 con los encontrados en CLD18A2.

20 Las proteínas CLD18 alteradas se generaron mediante la mutación del ácido nucleico que codifica la respectiva isoforma CLD18 y la clonación de los ácidos nucleicos mutados en un vector de expresión estándar.

La unión reducida de los anticuerpos probados frente a las variantes de la CLD18A2 generadas y el aumento de la unión hacia las variantes de la CLD18A1 generadas se controlaron mediante análisis por citometría de flujo. También se incluyeron en el análisis CLD18A1 y CLD18A2 de tipo salvaje no modificado.

30 Para este fin, las células HEK293 se transfectaron transitoriamente con ácidos nucleicos que codifican CLD18A1 de tipo salvaje o CLD18A2 o las variantes mutantes de las mismas para generar células que expresan CLD18A1 o CLD18A2 humanas. Los transfectantes se incubaron con los anticuerpos ensayados de la invención y las características de unión se analizaron mediante citometría de flujo.

35 El anticuerpo monoclonal de ratón 44 E4 D3 F11 (182-D1106-179, IgG2a, κ) reconoce tanto CLD18A1 como CLD18A2 en la superficie de la célula. El anticuerpo ch-175D10 mostró una unión fuerte y específica al CLD18A2 de tipo salvaje (ver Tab. 7). El anticuerpo ch-175D10 no se une a las variantes 3, 4 y 6 de la CLD18A2 que tienen las siguientes sustituciones de aminoácidos: variante 3: A42S; variante 4: N45Q; variante 6: E56Q. Tampoco se observó unión a las variantes dobles de la CLD18A2 que contienen al menos una de las sustituciones de aminoácidos individuales de las variantes 3 y 4.

Tab. 8: Unión específica y reconocimiento de epítopos de anticuerpos quiméricos a CLD18 A2

anticuerpo		MDQWSTQDLYNNPVT	STQDLYNNPVTAVFN	LYNNPVTAVFNYQGL	PVTAVFNYQGLWRSC	VFNYQGLWRSCVRES	QGLWRSCVRESSGFT	RSCVRESSGFTECRG
	Péptido	1	2	3	4	5	6	7
	SEQ ID NO:	151	152	153	154	155	156	157
ch-175D10	Sin intercambio	++					+	+++
	Intercambio Cys-Ser	++					+	+
ch-163E12	Sin intercambio	+++		+++		+++	+++	
	Intercambio Cys-Ser	+++		+++		+++	+++	

5 Ambos anticuerpos ch-175D10 y ch-163E12 reconocen un epítopo discontinuo (conformacional) con al menos dos sitios de unión que indican que los residuos de aminoácido clave están distribuidos en dos o más regiones de unión que están separadas en la estructura de proteína primaria. Tras el plegado, estas regiones de unión se unen en la superficie de la proteína para formar un epítopo compuesto. La fuerte unión del anticuerpo ch-175D10 a los péptidos 1 y 7 sin intercambio de cisteína, pero con una ligera unión al péptido 7 que contiene serinas en lugar de las dos cisteínas, indica el papel central de las cisteínas para el reconocimiento de epítopos y probablemente el plegamiento de proteínas (Figura 36). Nuestros datos sugieren tres modelos diferentes de plegamiento de proteínas para el primer dominio extracelular de la CLD18A2 que contiene el epítopo para ambos anticuerpos quiméricos (Figura 37). El primer modelo mostrado en la Figura 37 representa el péptido lineal 7 que contiene ambas cisteínas, el segundo modelo muestra un enlace disulfuro intramolecular que da como resultado un ciclo, y el tercer modelo describe dos cisteínas que forman dos enlaces disulfuro intermoleculares.

12. Determinación de la afinidad de anticuerpos

15 Para la determinación de las constantes de unión a través del análisis de Scatchard, la unión de los anticuerpos de la invención a CLD18A2 humana se puede valorar en células HEK293 que expresan de manera estable CLD18A2 y se analizan mediante citometría de flujo. Los anticuerpos humanos o quiméricos de la invención se pueden detectar mediante un sándwich de IgG de ratón no conjugado antihumano e IgG de cabra anti-ratón conjugado con FITC. Cada paso de incubación de anticuerpos se puede realizar durante 30 minutos a 4°C seguido de 2 lavados en regulador FACS. Los anticuerpos murinos de la invención se pueden detectar directamente con el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón conjugado con FITC. La detección de sándwich de anticuerpos de la invención usando anticuerpos secundarios y terciarios podría ser necesaria para cuantificar el número de anticuerpos unidos de la invención utilizando el kit QIFIKIT (DAKO, Glostrup, Dinamarca). Con este kit, el número de anticuerpos unidos se puede determinar mediante citometría de flujo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se puede obtener una relación estrictamente lineal de intensidad de fluorescencia media e IgG unida. Los datos pueden analizarse mediante el trazado de Scatchard y mediante la determinación de KD directamente a partir de las curvas de unión. Las constantes de disociación pueden calcularse de acuerdo con Krause et al., Behring Inst. Mitt. 87: 56-67, 1990 y Nauendorf et al., Int J Cancer 100:101-120, 2002.

De acuerdo con la enseñanza, las constantes de disociación para anticuerpos de la invención se determinaron mediante un ensayo de unión basado en citometría de flujo usando células HEK293-CLD18A2 que expresan de manera estable CLD18A2. El análisis de Scatchard de datos de unión a células produjo un intervalo de constantes de disociación de 10^{-8} M a 10^{-9} M para 175D10 murino y quimérico y 163E12. Las constantes de disociación se calcularon de acuerdo con Krause et al., Behring Inst. Mitt. 87: 56-67, 1990 y Nauendorf et al., Int J Cancer 100:101-120, 2002.

5

13. Reactividad cruzada ortóloga

La unión a CLD18A2 y CLD18A1 humana y murina se analizó mediante citometría de flujo. Se incubaron células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 murina (SEQ ID NOs: 33, 35), o con un marcador de fluorescencia y CLD18A1 murina (SEQ ID NOs: 36, 37), o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 humana (SEQ ID NOs: 1, 2), o con un marcador de fluorescencia y CLD18A1 humana (SEQ ID NOs: 7, 8) con ch-175D10, ch-163E12 y ch-125E1 durante 30 minutos a 4°C, seguido de incubación con anticuerpo secundario IgG antihumano acoplado a alofococianina (30 minutos 4°C).

10

La Figura 38 muestra el perfil de unión para los anticuerpos ch-175D10, ch-163E12 y ch-125E1. Estos anticuerpos son herramientas valiosas para determinar una posible toxicidad de anticuerpos monoclonales CLD18 en estudios preclínicos, como se describe en el ejemplo 3j para sus homólogos murinos.

15

14. La CLD18A2 muestra una expresión alta de la membrana plasmática en tumores gástricos primarios y metástasis de cáncer gástrico.

La muestra no seleccionada de cáncer gástrico primario y metástasis de cáncer gástrico (tumores de Krukenberg y nódulos linfáticos) se tiñeron con antisuero de conejo específico de GC182. La inmunohistoquímica, así como la evaluación de la intensidad de la tinción (negativa, débil = 1, moderada = 2, fuerte = 3) y la proporción de células tumorales que muestran una tinción de la membrana plasmática (0-100%) fueron realizadas por patólogos clínicos profesionales; véase Figura 39. En la Figura 39, cada círculo representa una muestra tumoral independiente. Se observó una intensidad de tinción aumentada estadísticamente significativa en metástasis ($p=0.034$, prueba exacta de Fisher).

20

Referencia de archivo del solicitante o agente	342-38 PCT	Solicitud internacional No.	PCT/EP2008/004197
--	------------	-----------------------------	-------------------

INDICACIONES RELACIONADAS CON MICROORGANISMOS DEPOSITADOS
U OTRO MATERIAL BIOLÓGICO

(Regla 13bis de PCT)

A. Las indicaciones hechas a continuación se relacionan con el microorganismo depositado u otro material biológico denominado en la descripción en la página 19 , línea 1 .	
B. IDENTIFICACIÓN DE DEPÓSITO Depósitos adicionales son identificados en una hoja adicional <input checked="" type="checkbox"/>	
Nombre de la institución depositaria DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Dirección de la institución depositaria (incluyendo código postal y país) Mascheroder Weg 1b 38124 Braunschweig DE	
Fecha del depósito 19 de octubre de 2005	Número de acceso DSM ACC2737
C. INDICACIONES ADICIONALES (Dejar en blanco si no es aplicable) Esta información continúa en una hoja adicional <input type="checkbox"/>	
- Mieloma de ratón (Mus musculus) P3X63Ag8U.1 fusionado con esplenocitos de ratón (Mus musculus) - Hibridoma que secreta anticuerpos contra claudin-18A2 humano	
D. ESTADOS DESIGNADOS PARA LOS QUE SE HACEN INDICACIONES (si las indicaciones no son para todos los Estados designados)	
E. PRESENTACIÓN SEPARADA DE INDICACIONES (dejar en blanco si no es aplicable)	
Las indicaciones listadas a continuación se presentarán a la Oficina Internacional más adelante (especificar la naturaleza general de las indicaciones por ejemplo, "Número de Acceso del Depósito")	

<p>Para uso solo de la Oficina receptora</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Esta hoja fue recibida con la solicitud internacional</p> <hr/> <p>Oficial autorizado</p> <p>Poels, Richard</p>	<p>Para uso solo de la Oficina Internacional</p> <p><input type="checkbox"/> Esta hoja fue recibida por la Oficina Internacional</p> <hr/> <p>Oficial autorizado</p>
---	--

Hoja adicional para material biológico

Identificación de depósitos adicionales:

- 5 1) El nombre y la dirección de la institución depositaria para los depósitos (DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC-2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748) son los siguientes:

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Mascheroder Weg 1b

38124 Braunschweig

DE

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

DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Inhoffenstr. 7 B

38124 Braunschweig

- 15 DE

Fecha de los depósitos	Números de acceso	Las indicaciones que se incluyen a continuación se relacionan con el microorganismo depositado en la descripción de las siguientes páginas
Octubre 19, 2005	DSM ACC2738	página 19, línea 2
Octubre 19, 2005	DSM ACC2739	página 19, línea 3
Octubre 19, 2005	DSM ACC2740	página 19, línea 4
Octubre 19, 2005	DSM ACC2741	página 19, línea 5
Octubre 19, 2005	DSM ACC2742	página 19, línea 6
Octubre 19, 2005	DSM ACC2743	página 19, línea 7
Noviembre 17, 2005	DSM ACC2745	página 19, línea 8
Noviembre 17, 2005	DSM ACC2746	página 19, línea 9
Noviembre 17, 2005	DSM ACC2747	página 19, línea 10
Noviembre 17, 2005	DSM ACC2748	página 19, línea 11
Octubre 26, 2006	DSM ACC2808	página 19, línea 12
Octubre 26, 2006	DSM ACC2809	página 19, línea 13
Octubre 26, 2006	DSM ACC2810	página 19, línea 14

Indicaciones adicionales para todos los depósitos mencionados anteriormente:

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

3) Depositante:

5 Todos los depósitos mencionados anteriormente fueron hechos por:

Ganymed Pharmaceuticals AG

Freiligrathstraße 12

55131 Mainz

DE

10 Listado de secuencias

<110> Ganymed Pharmaceuticals AG et al.

<120> ANTICUERPOS MONOCLONALES CONTRA CLAUDINA 18 PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 342-38 PCT

<150> EP 07 010 622.4

15 <151> 2007-05-29

<150> US 60/932,099

<151> 2007-05-29

<160> 157

<170> PatentIn version 3.3

20 <210> 1

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

ES 2 675 375 T3

```

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgctggc      60
atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtacaa caaccccgta     120
acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc     180
accgagtgcc ggggctactt caccctgctg gggctgccag ccatgctgca ggcagtgcga     240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctggtatc catctttgcc     300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc     360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggtctt tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc     420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg     480
atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttggtgcgg ctctgttcgt gggctgggtc     540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca     600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct cgggccacag tgttgccctac     660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acaccaaaaa caagaagata     720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttcaa gcacgactat     780
gtgtaa                                             786

```

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Ala Val Thr Ala Cys Gln Gly Leu Gly Phe Val Val Ser Leu Ile
 1           5           10           15
Gly Ile Ala Gly Ile Ile Ala Ala Thr Cys Met Asp Gln Trp Ser Thr
 20           25           30

```

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 3

<211> 816

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 675 375 T3

```

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

```

<210> 4

<211> 271

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 375 T3

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

Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Met Val Gln Thr Val Gln
165 170 175

Thr Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly
180 185 190

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 813

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 675 375 T3

atggccgtga ctgcctgtca gggcttgggg ttcgtggttt cactgattgg gattgcgggc 60
 atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtaaa caaccccgta 120
 acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180
 accgagtgcc ggggctactt caccctgtac ccatacgagc tgccagacta cgcactgggg 240
 ctgccagcca tgctgcaggc agtgcgagcc ctgatgatcg taggcatcgt cctgggtgcc 300
 attggcctcc tggatccat ctttgccctg aaatgcatcc gcattggcag catggaggac 360
 tctgccaag ccaacatgac actgacctcc gggatcatgt tcattgtctc aggtctttgt 420
 gcaattgctg gagtgtctgt gtttgccaac atgctgggta ctaacttctg gatgtccaca 480
 gctaacatgt acaccggcat ggggtgggatg gtgcagactg ttcagaccag gtacacattt 540
 ggtgcggctc tgttcgtggg ctgggtcgct ggaggcctca cactaattgg ggggtgtgatg 600
 atgtgcatcg cctgccgggg cctggcacca gaagaaacca actacaaagc cgtttcttat 660
 catgcctcgg gccacagtgt tgcctacaag cctggaggct tcaaggccag cactggcttt 720
 gggccaaca ccaaaaaca gaagatatac gatggagggtg cccgcacaga ggacgaggta 780
 caatcttatc cttccaagca cgactatgtg taa 813

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Asn Met Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr
165 170 175

Arg Tyr Thr Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp Val Ala Gly Gly
180 185 190

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

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

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

ES 2 675 375 T3

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

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

<210> 7

<211> 786

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 7

```

atgtccacca ccacatgcca agtggtggcg ttctcctgt ccatcctggg gctggccggc      60
tgcacgcggy ccaccgggat ggacatgtgg agcaccagg acctgtacga caaccccgtc      120
acctccgtgt tccagtacga agggctctgg aggagctgcy tgaggcagag ttcaggcttc      180
accgaatgca ggccctattt caccatcctg ggacttccag ccatgctgca ggcagtgcga      240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctggtatc catctttgcc      300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc      360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggctct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc      420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg      480
atggtgcaga ctgttcagac caggtacaca tttggtgcyg ctctgttcgt gggctgggct      540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca      600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgcctac      660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata      720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat      780
gtgtaa                                             786
    
```

<210> 8

<211> 261

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val
 260

<210> 9

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 675 375 T3

atggccacca ccacgtgcca ggtggtagg cttctcctgt ccctcctggg tctggccggc 60
 tgcatagccg ccaactgggat ggacatgtgg agcactcaag acctgtatga caaccagtc 120
 accgccgtgt tccagtatga agggctctgg aggagtgcg tgcaacagag ctcggggttc 180
 accgagtgcc ggccatactt caccatcctg ggccttcag ccatgctgca agctgtacga 240
 gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggtg taactcgtgtc catcttcgcc 300
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360
 tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttgggtgtgtc tgtgtttgcc 420
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480
 atgggtggca tgggtgcagac cgttcagacc aggtacacct ttgggtgcagc tctgttcgtg 540
 ggctggggtt ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660
 gttgcctaca ggcctggagg cttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720
 aagaagatct acgatggggg tgcccgcaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780
 tatgactatg tgtag 795

<210> 10

<211> 795

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 10
 atgtcgggtga ccgcctgcca gggcttgggg tttgtggtgt cactgatcgg gtttgccggc 60
 atcattgcag ccaactgtat ggaccagtgg agcaccagc atttatacaa caaccgggtg 120
 accgctgtat tcaactacca agggctatgg cgttcatgcg tccgagagag ctctggcttc 180
 accgagtgcc gaggctactt caccctgttg gggttgcccag ccatgctgca agctgtacga 240
 gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggtg taactcgtgtc catcttcgcc 300
 ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360
 tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttgggtgtgtc tgtgtttgcc 420
 aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480
 atgggtggca tgggtgcagac cgttcagacc aggtacacct ttgggtgcagc tctgttcgtg 540
 ggctggggtt ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600
 ggctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660
 gttgcctaca ggcctggagg cttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720
 aagaagatct acgatggggg tgcccgcaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780
 tatgactatg tgtag 795

<210> 11

<211> 21

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 11

tggtctgtg tcgacctgt g 21

5 <210> 12

<211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 12

gtgtacatgt tagctgtgga c 21

<210> 13

<211> 55

15 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

<210> 14

20 <211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

ES 2 675 375 T3

Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
 20 25 30
 Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45
 Met Leu Gln Ala Val Arg Ala Leu Met Ile Val Gly Ile Val Leu Gly
 50 55 60
 Ala Ile Gly Leu Leu Val Ser Ile Phe Ala Leu Lys Cys Ile Arg Ile
 65 70 75 80
 Gly Ser Met Glu Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
 85 90 95
 Ile Met Phe Ile Val Ser Gly Leu Cys Ala Ile Ala Gly Val Ser Val
 100 105 110
 Phe Ala Asn Met Leu Val Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met
 115 120 125
 Tyr Thr Gly Met Gly Gly Met Val Gln Thr Val Gln Thr Arg Tyr Thr
 130 135 140
 Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
 145 150

<210> 15

<211> 390

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcgcgc cgtacgaagc ttggtaccga gctcggatcc 120
 actccagtgt ggtggaattc tgcagatggc cgcattggacc agtggagcac ccaagacttg 180
 tacaacaacc ccgtaacagc tgttttcaac taccaggggc tgtggcgctc ctgtgtccga 240
 gagagctctg gcttcaccga gtgccggggc tacttcaccc tgctggggct gccagccatg 300
 ctgcaggcag tgcgagcggc catccagcac agtggcggcc gctcaggag ggcccgaaca 360
 aaaactcatc tcagaagagg atctgaatag 390

<210> 16

10 <211> 129

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 675 375 T3

<400> 16

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

<210> 17

5 <211> 411

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 17

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

10 <210> 18

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

ES 2 675 375 T3

<400> 18

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

<210> 19

<211> 531

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacgcggccc agccggccag gcgcgcatg gaccagtgga gcaccaaga cttgtacaac 120
 aaccccgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gtcctgtgt ccgagagagc 180
 tctggcttca ccgagtgccg gggctacttc accctgctgg ggctgccagc catgctgcag 240
 gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcatc gtctgggtg ccattggcct cctggtatcc 300
 atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgcca agccaacatg 360
 aactgacct ccgggatcat gttcattgtc tcaggcttt gtgcaattgc tggagtgtct 420
 gtgtttgcca acatgctggt gactaacttc tggatgtcca cagctaacat gtacaccggc 480
 atgggtggga tgggtgcagac tggtcagacc aggtacacat ttggtgcgta g 531

<210> 20

ES 2 675 375 T3

<211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

5 <210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

10 <210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15 <400> 24

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

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

20 <213> Homo sapiens

<400> 25

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

<210> 26

<211> 13

25 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

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

<210> 27

30 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28

<211> 55

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50 55

<210> 29

<211> 24

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
 20

<210> 30

15 <211> 40

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
 35 40

20

<210> 31

ES 2 675 375 T3

<211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 32

<211> 3359

<212> ADN

<213> Homo sapiens

10 <400> 32

cacaccttcg gcagcaggag ggcggcagct tctcgcaggc ggcagggcgg gcggccagga 60
tcatgtccac caccacatgc caagtgggtg cgttcctcct gtccatcctg gggctggccg 120
gctgcatcgc ggccaccggg atggacatgt ggagcaccca ggacctgtac gacaaccccg 180
tcacctccgt gttccagtac gaagggctct ggaggagctg cgtgaggcag agttcaggct 240

ES 2 675 375 T3

tcaccgaatg caggccctat ttcacatcc tgggacttcc agccatgctg caggcagtgc 300
 gagccctgat gatcgtaggc atcgtcctgg gtgccattgg cctcctggta tccatctttg 360
 ccctgaaatg catccgcatt ggcagcatgg aggactctgc caaagccaac atgacactga 420
 cctccgggat catgttcatt gtctcaggtc tttgtgcaat tgctggagtg tctgtgtttg 480
 ccaacatgct ggtgactaac ttctggatgt ccacagctaa catgtacacc ggcattgggtg 540
 ggatggtgca gactgttcag accaggtaaca catttgggtc ggctctgttc gtgggctggg 600
 tcgctggagg cctcacacta attgggggtg tgatgatgtg catcgcctgc cggggcctgg 660
 caccagaaga aaccaactac aaagccgttt cttatcatgc ctcaggccac agtgttgcct 720
 acaagcctgg aggcttcaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaa aacaagaaga 780
 tatacgatgg aggtgcccgc acagaggacg aggtacaatc ttatccttc aagcacgact 840
 atgtgtaatg ctctaagacc tctcagcacg ggcggaagaa actcccggag agctcaccca 900
 aaaaacaagg agatcccac tagatttctt ctgcttttg actcacagct ggaagttaga 960
 aaagcctcga tttcatcttt ggagaggcca aatggtctta gcctcagtct ctgtctctaa 1020
 atattccacc ataaaacagc tgagttattt atgaattaga ggctatagct cacattttca 1080
 atcctctatt tcttttttta aatataactt tctactctga tgagagaatg tggttttaat 1140
 ctctctctca cattttgatg atttagacag actccccctc ttctcctag tcaataaacc 1200
 cattgatgat ctatttccca gcttatcccc aagaaaactt ttgaaaggaa agagtagacc 1260
 caaagatggt attttctgct gtttgaattt tgtctcccca cccccaactt ggctagtaat 1320
 aaacacttac tgaagaagaa gcaataagag aaagatattt gtaatctctc cagcccatga 1380
 tctcggtttt cttacactgt gatcttaaaa gttaccaaac caaagtcatt ttcagtttga 1440
 ggcaaccaa cttttctact gctgttgaca tcttcttatt acagcaacac cattctagga 1500
 gtttctgag ctctccactg gagtcctctt tctgtcgcgg gtcagaaatt gtccttagat 1560
 gaatgagaaa attatttttt ttaatttaag tcctaaatat agttaaata aataatgttt 1620
 tagtaaaatg atacactatc tctgtgaaat agcctcacc ctacatgtgg atagaaggaa 1680
 atgaaaaaat aattgctttg acattgtcta tatggtactt tgtaaagtca tgcttaagta 1740
 caaattccat gaaaagctca ctgaccta tctttccct ttgaggtctc tatggctctg 1800
 attgtacatg atagtaagtg taagccatgt aaaaagtaaa taatgtctgg gcacagtggc 1860
 tcacgcctgt aatcctagca ctttgggagg ctgaggagga aggatcactt gagcccagaa 1920
 gttcgagact agcctgggca acatggagaa gccctgtctc taaaaatac agagagaaaa 1980
 aatcagccag tcatggtggc ctacacctgt agtcccagca ttccgggagg ctgaggtggg 2040
 aggatcactt gagcccaggg aggttggggc tgcagtgagc catgatcaca cactgcact 2100
 ccagccaggt gacatagcga gatcctgtct aaaaaataa aaaataaata atggaacaca 2160
 gcaagtccta ggaagtaggt taaaactaat tctttaaaa aaaaaaaaag ttgagcctga 2220
 attaaatgta atgtttccaa gtgacaggta tccacatttg catggttaca agccactgcc 2280

ES 2 675 375 T3

agttagcagt agcactttcc tggcactgtg gtcggttttg ttttgtttg ctttgtttag 2340
 agacggggtc tcactttcca ggctggcctc aaactcctgc actcaagcaa ttcttctacc 2400
 ctggcctccc aagtagctgg aattacaggt gtgcgccatc acaactagct ggtggtcagt 2460
 tttgttactc tgagagctgt tcacttctct gaattcacct agagtggttg gaccatcaga 2520
 tgtttgggca aaactgaaag ctctttgcaa ccacacacct tccctgagct tacatcactg 2580
 cctttttgag cagaaagtct aaattcctc caagacagta gaattccatc ccagtaccaa 2640
 agccagatag gccccctagg aaactgaggt aagagcagtc tctaaaaact acccacagca 2700
 gcattggtgc aggggaactt ggccattagg ttattatttg agaggaaagt cctcacatca 2760
 atagtacata tgaaagtgac ctccaagggg attggtgaat actcataagg atcttcaggc 2820
 tgaacagact atgtctgggg aaagaacgga ttatgcccc a taaataaca agttgtgttc 2880
 aagagtcaga gcagtgagct cagaggcct tctcactgag acagcaacat ttaaaccaaa 2940
 ccagaggaag tatttgtgga actcactgcc tcagtttggg taaaggatga gcagacaagt 3000
 caactaaaga aaaaagaaaa gcaaggagga gggttgagca atctagagca tggagtttgt 3060
 taagtgtctc ctggatttga gttgaagagc atccatttga gttgaaggcc acagggcaca 3120
 atgagctctc ctttctacca ccagaaagtc cctggtcagg tctcaggtag tgcggtgtgg 3180
 ctcagctggg tttttaatta ggcattctc tatccaacat ttaattgttt gaaagcctcc 3240
 atatagttag attgtgcttt gtaattttgt tgttgttgc ctatcttatt gtatatgcat 3300
 tgagtattaa cctgaatggt ttgttactta aatattaaa aactgttat cctacagtt 3359

<210> 33

<211> 849

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 33

gagaacctgc ctgtctcttg tcctctccat ttgtgtggac tctgtgctcc atcatgtcgg 60
 tgaccgcctg ccagggcctg gggtttgtgg tgtcactgat cgggtttgcg ggcatcattg 120
 cagccacttg tatggaccag tggagcacc aggattata caacaacccg gtgaccgctg 180
 tattcaacta ccaagggcta tggcgttcat gcgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240
 gccgaggcta cttcacctg ttggggttgc cagcatgct gcaagctgta cgagccctga 300
 tgatcgtggg cattgttctg ggggtcatcg gtatcctcgt gtccatctc gccctgaagt 360
 gcattcgc at tggtagcatg gatgactctg ccaaggccaa gatgactctg acttctggga 420
 tcttgttcat catctccggc atctgtgcaa tcattggtgt gtctgtgttt gccaacatgc 480
 tggtgaccaa cttctggatg tccacagcta acatgtacag cggcatgggc ggcatgggtg 540
 gcatggtgca gaccgttcag accaggtaca ccttcggtgc agctctgttc gtgggctggg 600
 ttgctggagg cctcacctg attgggggag tgatgatgtg catcgctgc cgtggcctga 660
 caccagatga cagcaacttc aaagctgtgt cttaccatgc ctctggccaa aatgttgct 720

ES 2 675 375 T3

acaggcctgg aggctttaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaga aacaagaaga 780
 tctacgatgg ggggtgcccgc acagaagacg atgaacagtc tcatcctacc aagtatgact 840
 atgtgtagt 849

<210> 34

<211> 3350

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 34

agaattgctg tgtccacttg tcgtgtggct ctgtgtcgac actgtgctgc accatggccg 60
 tgactgcctg tcagggcctg gggttcgtgg tttcactgat tgggattgcg ggcattcattg 120
 ctgccacctg catggaccag tggagcacc aagacttgta caacaacccc gtaacagctg 180
 ttttcaacta ccaggggctg tggcgctcct gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240
 gccggggcta cttcaccctg ctggggctgc cagccatgct gcaggcagtg cgagccctga 300
 tgatcgtagg catcgtcctg ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gccctgaaat 360
 gcatccgcat tggcagcatg gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acctccggga 420
 tcatgttcat tgtctcaggt ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacatgc 480
 tgggtgactaa cttctggatg tccacagcta acatgtacac cggcatgggt gggatgggtc 540
 agactgttca gaccaggtac acatttggtg cggctctggt cgtgggctgg gtcgctggag 600
 gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcatcgctg cgggggctg gcaccagaag 660
 aaaccaacta caaagccggt tcttcatatg cctcaggcca cagtgttgcc tacaagcctg 720
 gaggttcaa ggccagcact ggctttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacgatg 780
 gaggtgcccg cacagaggac gaggtacaat cttatcctc caagcacgac tatgtgtaat 840
 gctctaagac ctctcagcac gggcggaaga aactcccga gagctcacc aaaaaacaag 900
 gagatcccat ctagatttct tcttgctttt gactcacagc tggagtttag aaaagcctcg 960
 atttcatctt tggagaggcc aaatggctct agcctcagtc tctgtctcta aatattccac 1020
 cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggctatagc tcacatttct aatcctctat 1080
 tctttttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtggttttta tctctctctc 1140
 acattttgat gatttagaca gactccccct cttcctccta gtcaataaac ccattgatga 1200
 tctatttccc agcttatccc caagaaaact tttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt 1260
 tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc accccaact tggctagtaa taaacactta 1320
 ctgaagaaga agcaataaga gaaagatatt tgtaatctct ccagcccatg atctcggttt 1380
 tcttacctg tgatcttaaa agttaccaa ccaaagtcatt tttcagtttg aggcaaccaa 1440
 acctttctac tgctgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttctgta 1500
 gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggctcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa 1560
 aattattttt ttaatttaa gtcctaaata tagttaaaat aaataatggt ttagtaaaat 1620
 gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgaaaaaa 1680

ES 2 675 375 T3

taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaattcca 1740
 tgaagagctc actgatccta attctttccc tttgaggtct ctatggctct gattgtacat 1800
 gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataatgtctg ggcacagtgg ctcacgcctg 1860
 taatcctagc actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttcgagac 1920
 tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aaatcagcca 1980
 gtcattggtg cctacacctg tagtcccagc attccgggag gctgaggtgg gaggatcact 2040
 tgagcccagg gaggttgggg ctgcagtgag ccatgatcac accactgcac tccagccagg 2100
 tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaataaat aatggaacac agcaagtcct 2160
 aggaagtagg ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt 2220
 aatgtttcca agtgacaggt atccacattt gcatggttac aagccactgc cagttagcag 2280
 tagcactttc ctggcactgt ggtcggtttt gttttgtttt gctttgttta gagacggggt 2340
 ctacttttc aggctggcct caaactcctg cactcaagca attcttctac cctggcctcc 2400
 caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tggtggtcag ttttgttact 2460
 ctgagagctg ttcacttctc tgaattcacc tagagtggtt ggaccatcag atgtttgggc 2520
 aaaactgaaa gctctttgca accacacacc ttcctgagc ttacatcact gcccttttga 2580
 gcagaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat cccagtacca aagccagata 2640
 ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacacagc agcattggtg 2700
 caggggaact tggccattag gttattattt gagaggaaag tcctcacatc aatagtacat 2760
 atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac 2820
 tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagttgtggt caagagtcag 2880
 agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaaccaa accagaggaa 2940
 gtatttgtgg aactcactgc ctgagtttg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag 3000
 aaaaaagaaa agcaaggagg agggttgagc aatctagagc atggagtttg ttaagtgtc 3060
 tctggatttg agttgaagag catccatttg agttgaaggc cacagggcac aatgagctct 3120
 cccttctacc accagaaagt ccctggtcag gtctcaggta gtgagggtg gctcagctgg 3180
 gtttttaatt agcgcattct ctatccaaca ttttaattgtt tgaaagcctc catatagtta 3240
 gattgtgctt tgtaattttg ttgttgttgc tctatcttat tgtatatgca ttgagtatta 3300
 acctgaatgt tttgttactt aatatataaa aacactgtta tcctacagtt 3350

<210> 35

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 35

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

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

<211> 2786

<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 36

ES 2 675 375 T3

ggccggaac cttcccagca agaggggtggt ggttgctcct ggaagcctgc gccagcagc 60
 tgaagccatg gccaccacca cgtgccaggt ggtagggctt ctctgtccc tcctgggtct 120
 ggccggctgc atagccgcca ctgggatgga catgtggagc actcaagacc tgtatgacaa 180
 cccagtcacc gccgtgttcc agtatgaagg gctctggagg agttgctgac aacagagctc 240
 ggggttcacc gagtgccggc catacttcac catcctgggc cttccagcca tgctgcaagc 300
 tgtacgagcc ctgatgatcg tgggcattgt tctgggggtc atcggtatcc tcgtgtccat 360
 cttcgccctg aagtgcattc gcattggtag catggatgac tctgccaagg ccaagatgac 420
 tctgacttct gggatcttgt tcatcatctc cggcatctgt gcaatcattg gtgtgtctgt 480
 gtttgccaac atgctggtga ccaacttctg gatgtccaca gctaacatgt acagcggcat 540
 gggcggcatg ggtggcatgg tgcagaccgt tcagaccagg tacaccttcg gtgcagctct 600
 gttcgtgggc tgggttgctg gaggcctcac cctgattggg ggagtgatga tgtgcatcgc 660
 ctgccgtggc ctgacaccag atgacagcaa cttcaaagct gtgtcttacc atgcctctgg 720
 ccaaaatggt gcctacaggc ctggaggctt taaggccagc actggctttg ggtccaacac 780
 cagaaacaag aagatctacg atgggggtgc ccgacagaa gacgatgaac agtctcatcc 840
 taccaagtat gactatgtgt agtgctctaa gaccgcca cctgtgtgca ggaggaaccc 900
 tcccccaaga agagctcacc ccaaagcaac gggagtctac cttgttcctt tgttgatttc 960
 aactgacatc tgaaagttgg taaagcctga ttttcatcca tagggaggct agacagtctt 1020
 ggccacatgt gtctgcctct aatatccca tcacaaaaca gctgagttat cgtttatgag 1080
 ttagaggcca taacactcac tttagcccaa ccctctgctt tttaccgtag actttctttt 1140
 catctggtga tggaatggaa tttgactcac agactaatac tttaatgggt tagagaaact 1200
 ttccttctc gtacttaata agcctgctga tggctgattt tccagcttga ccaccaaggg 1260
 aaattttaa aggaaaaaa aatacattaa aaggcattat ttcctactca attgtgcctt 1320
 acccaccccc aacttgactg ataataataa tgaacaccac ttaaagaaag aatgccagag 1380
 gaaagatagt tgtgtttccc cccagccagt catctgagtc cccctatgtg gtgatctaga 1440
 acattactcg ccacagtgat tttcaaagaa ggcaagcgag cctgttcgct ctgctcagca 1500
 tctgctgatt ccagcaaggc cttccagag cttccacta gaagtcctcc ttctctcgga 1560
 agtcagaaat tccccctaga agagtaagaa atagattctt ttgggtaacc tgagtcctag 1620
 gtatagttat aataaatagt atattagcaa aacggtttgg tatctcagtg aattagtttc 1680
 agccttacat atagaaaaag ctggggaaaa aaaaagcatc ccttgacatt gtctatagcg 1740
 taagatccta tataaatcca agcttcaaca aaagctcact gagtctaata gttttctttt 1800
 gaggtctcca cggccttagt actcatagat gcagcccctg tttaaaagta aaaaaattaa 1860
 agtagcttaa aacgggttct tttttttttt tttttttca aaaaatccaa tagagacctg 1920
 tgtgtctggc atagctacag ttactgcaa tcgacagggc cacttctttg gtcctgtagg 1980

ES 2 675 375 T3

cagttttgca gttctgacag ctgcgccggg catcaatatg cagaccacac ccttctctgt 2040
 gcttgtagga cgacccgttc aaggagaaag catgaactcc atctccatgt gagcctgaat 2100
 gctcccagga aatggagata gggtgctctc caaaaccac ctgaacctga aacagctgta 2160
 gcgctatgct gtaagagcct ggccatcaag ttcctatgga gaaaaagggc agtccttgca 2220
 ttaatagtgc atatataagt ggcctctggg gggcagggat gaatattcag tggtggtctc 2280
 gagtatgtac agaccgtcta aggagctgtg ttgaccaaga gccaggttaa tacgcagagt 2340
 ttttccact gggactacag tgattttaga ctatactgaa gaaggccctc tggaaaatca 2400
 ttatctgaaa tggcataaag aatgaacaga ccaacaatt taaggggagg gggcaggtgg 2460
 aaggaggggg aaggaggtag aaataagaat ctagggcatg aagattgtta aggttcttgg 2520
 ggtccaaatg gaaggtcacc cctttgaggc catggacaca atgcacccca cccctacccc 2580
 cacctgccca cccaccagaa agtccttggg cggactggag gcagtgagaa tcagctgttt 2640
 tcagttagtg ggtctcggtg tagcacctgg ctgtttcaa gcttcccctt gctttgccgt 2700
 tttttccgcc attgctgtct tgttttctgt gttattaacc tccatgtttt gtacgttaaa 2760
 tattaaaaca ctgttaacat ccattc 2786

<210> 37

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 37

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
 260

<210> 38

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 38

gagaggatcc cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac 40

10 <210> 39

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 39

gagagcggcc gcctaact ctcccctgtt gaagctc 37

<210> 40

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 40

```

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct      60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag      120
tggaagggtg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac      180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag      240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag      300
agcttcaaca ggggagagtg ttag                                           324
    
```

<210> 41

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 41

```

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

<210> 42

<211> 34

<212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 5 <400> 42
 gagaaagctt tccaccaagg gcccatcggc cttc 34
 <210> 43
 <211> 36
 <212> ADN
 10 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 43
 gagagcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag 36
 15 <210> 44
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 20 <223>
 Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 44
 taccagttga acttgacctc a 21
 <210> 45
 25 <211> 981
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR
 30 <400> 45

ES 2 675 375 T3

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 60
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 120
 gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 180
 ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 240
 gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 300
 aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 360
 ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 420
 gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 480
 gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 540
 gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 600
 aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcca agccaaaggg 660
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 720
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatcca gcgacatcg cgtggagtgg 780
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgct ggactccgac 840
 ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 900
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 960
 tccctgtctc cgggtaaagt a 981

<210> 46

<211> 326

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 46

ES 2 675 375 T3

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
 20 25 30
 Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
 35 40 45
 Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
 50 55 60
 Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
 65 70 75 80
 Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
 85 90 95
 Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
 100 105 110
 Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 115 120 125
 Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
 130 135 140
 Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 49
 ctgctcactg gatggtggga agatgg 26

5 <210> 50
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 50
 gggacagtca ctgagctgct cagag 25
 <210> 51
 <211> 25

15 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 51

20 acaggggcca gtgatagac cgatg 25
 <210> 52
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Artificial

25 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 52
 agccaggac caaggatag acagatg 27
 <210> 53

30 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

35 <400> 53
 gtaatacgac tcactatagg gcaagcagt gtaatcaacgc agat 45
 <210> 54

ES 2 675 375 T3

<211> 22
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 54
 gtaatagcgc tcactatagg gc 22
 <210> 55
 <211> 351
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR
 <400> 55
 15 caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60
tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120
cctggacatg gccttgagtg gattggagag atttacctg gaagtggtag tactaactac 180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctcaa cacagcctac 240
atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatatgat 300
tacccttggt ttgcttactg gggccaaggg actctggtca ctgtctctgc a 351
 <210> 56
 <211> 354
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR
 <400> 56
cagatccagt tggcgcagtc tggacctgag ctgaagaagc ctggagagac agtcaagatc 60
tcctgcaagg cttctgggta taccttcaca aactatggaa tgaactgggt gaagcaggct 120
ccaggaaagg gtttaaagtg gatgggctgg ataaacacca aacttgagaga gccaacatat 180
gctgaagagt tcaagggacg gtttgccttc tctttggaaa cctctgccag cactgcctat 240
ttgcagatca acaacctcaa aatgaggac acggctacat atttctgtgc aagactgggt 300
tttggaatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354
 25 <210> 57
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 675 375 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 57

```
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ccggggcttc agtgaagctg      60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact gactactata taaactgggt gaagcagagg      120
actggacagc gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagtggtaa tacttactac      180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagatcgat      300
ggtgcctttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca      348
```

5 <210> 58

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 58

```
caggccaac tgcagcagcc tggggctgag ctgggtgaggc ctggggcttc agtgaagctg      60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctactgga taaactgggt gaagcagagg      120
cctggacaag gccttgagtg gatcggaaat atttatcctt ctgatagtta tactaactac      180
aatcaaaagt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac      240
atgcagctca gcagcccagc atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatcgtag      300
aggggtaact cctttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcacagtctc ctca      354
```

<210> 59

15 <211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

20 <400> 59

```
caggttcagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatg      60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact gactatgtta taagctgggt gaagcagaga      120
actggacagc gccttgagtg gattggagag atttatcctg gaagtggtag tacttactac      180
aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccaa cacagcctac      240
atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagaggggta      300
ttactacggg ctatggacta ctggggtaaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca      354
```

<210> 60

ES 2 675 375 T3

<211> 360

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 60

```

caggttcacc tacaacagtc tggttctgaa ctgaggagtc ctgggtcttc agtaaagctt      60
tcatgcaagg attttgattc agaagtcttc ctttttgctt atatgagttg gattaggcag      120
aagcctgggc atggatttga atggattgga gacatactcc caagtattgg tagaacaatc      180
tatggagaga agtttgagga caaagccaca ctggatgcag acacagtgtc caacacagcc      240
tacttgagac tcaacagtct gacatctgag gactctgcta tctactactg tgcaaggggg      300
gagggctacg gtgcctgggt tgcttactgg ggccaagggg ctctgggtcac tgtctctgca      360

```

<210> 61

<211> 339

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 61

```

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

```

<210> 62

<211> 318

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 62

ES 2 675 375 T3

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

<210> 63

<211> 321

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223>

Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 63

gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60
 atcacctgca aggccagtca gaatgttcgt actgctgtag cctgggatca acagaaacca 120
 gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 240
 gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcggtgga 300
 10 ggcaccaagc tggaaatcaa a 321

<210> 64

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 64

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc cttagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 ccgctcacgt tgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

20 <210> 65

<211> 339

<212> ADN

ES 2 675 375 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 65

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctact 60
 atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
 5 ccattcacgt tcggctcggg gacaaagttg gaaataaaa 339

<210> 66

<211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

<400> 66

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

<210> 67

15 <211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR

20 <400> 67

gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtca gaggctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggtc 120
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagctctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 240
 atcagcagtg tgcaggctga agaccttgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 300
 ccgtacacgt tcggaggggg gaccaagctg gaaataaaa 339

ES 2 675 375 T3

<210> 68
 <211> 339
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR
 <400> 68
 gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
 ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339
 <210> 69
 10 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Producto de PCR
 15 <400> 69
 aacattgtaa tgaccaatc tcccaaacc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
 ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggt acttatgttt cctgggatca acagaaacca 120
 gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180
 cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct 240
 gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa a 321
 <210> 70
 <211> 43
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 70
 gagaaagctt gccgccacca tggaatggac ctgggtcttt ctc 43
 25 <210> 71
 <211> 43
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 71

5 **gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtc** 43

<210> 72
 <211> 47
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 72
 gagaaagctt gccgccacca tggattgct gtggaactg ctattcc 47
 <210> 73

15 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223>

20 Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 73
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc 44
 <210> 74
 <211> 46

25 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 74

30 gagaaagctt gccgccacca tggaatggat ctggatcttt ctcttc 46
 <210> 75
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial

35 <220><223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 75
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagt gtc 44

<210> 76
 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 76
 gagaaagctt gccccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttc 46
 <210> 77
 10 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 15 <400> 77
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43
 <210> 78
 <211> 47
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 78
 gagaaagctt gccccacca tggatggag gatctttctc tcatcc 47
 25 <210> 79
 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 79
 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc 44
 <210> 80
 <211> 51
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 80
 gagaggtctc aagcttagcc accatggact ggattggat catgctccat c 51
 <210> 81
 5 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 10 <400> 81
 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtcc 44
 <210> 82
 <211> 43
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 82
 gagaaagctt gccgccacca tggaaacaca gactcagtc ctc 43
 20 <210> 83
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 83
 cacacgtacg ttcagctcc agcttggctc cagc 34
 <210> 84
 <211> 46
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223>
 Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 35 <400> 84
 gagaaagctt gccgccacca tgcatttca agtcagatt ttcagc 46
 <210> 85

<211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 5 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 85
 cacacgtacg tttatttcc agcttgggtcc 30
 <210> 86
 <211> 44
 10 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 86
 15 gagaaagctt gccgccacca tggagtttca gaccagggtc ttg 44
 <210> 87
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 20 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 87
 cacacgtacg ttgatttcc agcttgggtgc ctc 33
 <210> 88
 25 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 30 <400> 88
 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccagggtt cttatg 46
 <210> 89
 <211> 30
 <212> ADN
 35 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 89
 cacacgtacg ttcagctcc agcttgggcc 30
 <210> 90
 <211> 46
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 90
 10 gagaaagctt gccgccacca tggatcaca gactcaggtc ctcattg 46
 <210> 91
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 91
 cacacgtacg ttttattcc aacttgggcc 30
 <210> 92
 20 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 25 <400> 92
 gagaaagctt gccgccacca tggatcaca ggcccaggtt ctatattg 49
 <210> 93
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 93
 cacacgtacg ttttattcc agcttgggcc 30
 35 <210> 94
 <211> 46
 <212> ADN

<213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 94
 5 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccagggtt cttatg 46
 <210> 95
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 10 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 95
 cacacgtacg ttttatttcc agcttgggtcc 30
 <210> 96
 15 <211> 46
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 20 <400> 96
 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggctcagggtt cttatg 46
 <210> 97
 <211> 33
 <212> ADN
 25 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 97
 cacacgtacg ttcagctcc agcttgggtcc cag 33
 30 <210> 98
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 35 <223>
 Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 98

ES 2 675 375 T3

gagaaagctt agccacatg gaatcacaga ctctggtctt c 41

<210> 99

<211> 30

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223>

Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 99

10 cacacgtacg ttcagctcc agcttggctc 30

<210> 100

<211> 1401

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 100

ES 2 675 375 T3

atggaatgga cctgggtcct tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccaactcccag 60
gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120
tgcaaggcta ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct 180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggtagtac taactacaat 240
gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atatgattac 360
ccctggtttg cttactgggg ccaagggact ctggctactg tctctgcagc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720
aaaactcaca catgccacc gtgccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaaccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcca agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtctc cgggtaaagt a 1401

<210> 101

<211> 1404

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 101

atggattggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60

ES 2 675 375 T3

atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
 tgcaaggctt ctgggtatac cttcaciaaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
 ggaaaggggt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aacatatgct 240
 gaagagttca agggacgggt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300
 cagatcaaca acctcaaaaa tgaggacacg gctacatatt tctgtgcaag actgggtttt 360
 ggtaatgcta tggactactg ggttcaagga acctcagtca ccgtctcctc agcctccacc 420
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca 540
 ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
 aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc 780
 ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggta agttcaactg gtacgtggac 900
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
 tgcaaggctt ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
 aaccaggctc gcctgacctg cctgggtcaa ggcttctatc ccagcgacat cggcgtggag 1200
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccg tctggactcc 1260
 gacggctcct tcttctcta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
 ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 102

<211> 1398

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 102

atggaatgga tctggatctt tctcttcac ctctcaggaa ctgcaggtgt cactccccag 60
 gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg gcgaggcccg gggcttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa gcagaggact 180
 ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt tatcctggaa gtggttaatac ttactacaat 240
 gagaagttca agggcaaggc cactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag atcgtatggt 360

ES 2 675 375 T3

gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagcctc caccaagggc 420
 ccatcggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggcctg 480
 ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc 540
 ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccggt gtcttacagt cctcaggact ctactcctc 600
 agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg 660
 aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtg agcccaaadc ttgtgacaaa 720
 actcacacat gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc 780
 ttcccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga cccctgaggt cacatgcgtg 840
 gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
 gaggtgcata atgccaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
 gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgaag 1020
 gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctcaaagc caaagggcag 1080
 ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
 gtcagcctga cctgcctggt caaaggctc tateccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
 agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
 tccttcttcc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
 ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
 ctgtctccgg gtaaatga 1398

<210> 103

<211> 1404

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 103

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccaactcccag 60
 gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac cttcaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct 180
 ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tatectctg atagttatac taactacaat 240
 caaaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
 cagctcagca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag atcgtggagg 360
 ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctctc agcctccacc 420
 aagggcccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctg gggcacagcg 480
 gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgtc gtggaactca 540
 ggcgcccctga ccagcggcgt gcacacctc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac 600
 tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660

ES 2 675 375 T3

aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctggggggg accgtcagtc 780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcggggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc 1260
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

<210> 104

<211> 1401

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 104

atggaatgga ggatctttct cttcatcctg tcaggaactg cagggtgtcca ctcccagggt 60
cagctgcagc agtctggacc tgagctgggtg aagcctgggg cttcagtga gatgtcctgc 120
aaggcttctg gatacacatt cactgactat gttataagct gggatgaagca gagaactgga 180
cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagtg gtagtactta ctacaatgag 240
aagttcaagg gcaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag 300
ctcagcagcc tgacatctga ggactctgag gtctatttct gtgcaagagg ggtattacta 360
cgggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgtg gaactcaggc 540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tggggggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaaccxaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc 840
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gagggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960

ES 2 675 375 T3

gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
 aaggctctca acaaagccct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
 cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
 caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
 gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
 ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
 gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
 tccctgtctc cgggtaaata a 1401

<210> 105

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 105

atggactgga tttggatcat gctccatctg ctggcagcag ctacaggtat ccaatcccag 60
 gttcacctac aacagtctgg ttctgaactg aggagtccctg ggtcttcagt aaagctttca 120
 tgcaaggatt ttgattcaga agtcttcctt tttgcttata tgagttggat taggcagaag 180
 cctgggcatg gatttgaatg gattggagac atactcccaa gtattggtag aacaatctat 240
 ggagagaagt ttgaggacaa agccacactg gatgcagaca cagtgtccaa cacagcctac 300
 ttggagctca acagtctgac atctgaggac tctgctatct actactgtgc aaggggggag 360
 ggctacggtg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt ctctgcagcc 420
 tccaccaagg gcccatcggg ctccccctg gcaccctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
 acagcggccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
 aactcaggcg ccctgaccag cggcgtgcac acettccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
 ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
 atctgcaacg tgaatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagaaagt tgagcccaaa 720
 tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
 tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gaccctgag 840
 gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac 900
 gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
 acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag 1020
 tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagccccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
 gccaaagggc agccccgaga accacaggtg tacaccctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
 accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
 gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260

ES 2 675 375 T3

gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
 caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
 aagagcctct ccctgtctcc gggtaaata 1410

<210> 106

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 106

atggaatcac agactcaggt cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctgg tacctgtggg 60
 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggtcact 120
 atgagctgca agtccagtc gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180
 tgggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240
 gaatctgggg tcctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300
 atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 360
 ccgctcacgt tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
 gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
 ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc 540
 caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
 ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
 gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
 tag 723

10 <210> 107

<211> 708

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 107

ES 2 675 375 T3

atgcattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
 agaggacaaa ttgtttctcac ccagtctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgactgggtt ccagcagaag 180
 ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtcctt 240
 gctcgtttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccaccac cacgttcgga 360
 ggggggacca agctggaaat aaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttcccg 420
 ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
 tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaaactcc 540
 caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
 acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt cacccatcag 660
 ggctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtgtag 708

<210> 108

<211> 705

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 108

atggagtttc agaccaggt ctttgtattc gtgttctctt ggttgtctgg tgttgatgga 60
 gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
 atcacctgca aggccagtc gaatgttcgt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180
 gggcagtctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 240
 cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 300
 gaagacctgg cagattattt ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcggtgga 360
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcc 420
 tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
 gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
 ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
 10 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtag 705

<210> 109

<211> 723

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

ES 2 675 375 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 109

```

atggattcac aggcccaggt tcttatgta ctgctgctat gggtatctgg tacctgtggg      60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact      120
atgagctgca agtccagtc gagcctttaa tatagtagca atcaaaaga ctacttgacc      180
tggtagcagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tttactgggc atccactagg      240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc      300
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat      360
ccgctcacgt tcgggtgctg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct      420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc      480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc      540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc      600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc      660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt      720
tag                                                                                   723

```

5 <210> 110

<211> 723

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 110

```

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

```

<210> 111

ES 2 675 375 T3

<211> 720

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 111

```
atggattcac aggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg      60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact      120
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct      180
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg      240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc      300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg      360
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtaggctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      660
gtcaccctac agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720
```

<210> 112

10 <211> 723

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

15 <400> 112

ES 2 675 375 T3

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

<210> 113

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223>

Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 113

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

<210> 114

<211> 705

ES 2 675 375 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

5 <400> 114

```

atggaatcac agactctggt cttcatatcc atactgctct ggttatatgg agctgatggg      60
aacattgtaa tgaccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc      120
ttgacctgca aggccagtga gaatgtgggtt acttatgttt cctgggatca acagaaacca      180
gagcagtctc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat      240
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct      300
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcggtgct      360
gggaccaagc tggagctgaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccccca      420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcctgctgaa taacttctat      480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                          705

```

<210> 115

<211> 466

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 115

```

Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
 1           5           10           15
Val His ser Gln val Gln Leu Gln Gln ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
           20           25           30

```

ES 2 675 375 T3

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
 50 55 60
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
 85 90 95
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 215 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 116

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 116

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

ES 2 675 375 T3

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

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

Thr Asp Tyr Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu
50 55 60

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

ES 2 675 375 T3

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

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys
465

<210> 118

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 118

ES 2 675 375 T3

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

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

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

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

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

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

ES 2 675 375 T3

100					105					110					
Tyr	Tyr	Cys	Thr	Arg	Ser	Trp	Arg	Gly	Asn	Ser	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
		115					120					125			
Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
	130					135					140				
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
145					150					155					160
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
				165					170					175	
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			180					185					190		
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
		195					200					205			
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
	210					215					220				
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
225					230					235					240
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
				245					250					255	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			260					265					270		
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His
		275					280					285			
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val
	290					295					300				
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr
305					310					315					320
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly
				325					330					335	
Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile
			340					345					350		
Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val
		355					360					365			
Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser

ES 2 675 375 T3

370		375		380																		
Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu							
385					390					395					400							
Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro							
				405					410					415								
Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val							
			420					425					430									
Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met							
		435					440					445										
His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser							
	450					455					460											

Pro Gly Lys
465

<210> 119

<211> 466

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 119

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

Phe Cys Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125

ES 2 675 375 T3

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 130 135 140
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
 145 150 155 160
 Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
 165 170 175
 Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
 180 185 190
 Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
 195 200 205
 Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
 210 220
 Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
 225 230 235 240
 Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 245 250 255
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
 260 265 270
 Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
 275 280 285
 Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 290 295 300
 Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 305 310 315 320
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 325 330 335
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 340 345 350
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 355 360 365
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 370 375 380
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 385 390 395 400

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 120

<211> 469

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 120

ES 2 675 375 T3

Met Asp Trp Ile Trp Ile Met Leu His Leu Leu Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ile Gln Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Gly Ser Glu Leu Arg Ser
 20 25 30

Pro Gly Ser Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val
 35 40 45

Phe Pro Phe Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly
 50 55 60

Phe Glu Trp Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr
 65 70 75 80

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

Asn Thr Ala Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110

Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 115 120 125

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

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly

ES 2 675 375 T3

420

425

430

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

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

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 121

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 121

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 122

<211> 235

5 <212> PRT

ES 2 675 375 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 122

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

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

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

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

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
100 105 110

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

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

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

5 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

ES 2 675 375 T3

				165						170						175
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	
			180					185					190			
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
		195					200					205				
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	
	210					215					220					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys						
225					230					235						

<210> 123

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 123

ES 2 675 375 T3

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

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20 25 30

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

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

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

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

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 124

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 124

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

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

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

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

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

5 Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys

ES 2 675 375 T3

145					150						155					160
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe 165	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala 170	Lys	Val	Gln	Trp	Lys 175	Val	
Asp	Asn	Ala	Leu 180	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser 185	Gln	Glu	Ser	Val	Thr 190	Glu	Gln	
Asp	Ser	Lys 195	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser 200	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu 205	Thr	Leu	Ser	
Lys	Ala 210	Asp	Tyr	Glu	Lys	His 215	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys 220	Glu	Val	Thr	His	
Gln 225	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro 230	Val	Thr	Lys	Ser	Phe 235	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys 240	

<210> 125

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 125

ES 2 675 375 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 126

<211> 239

5 <212> PRT

ES 2 675 375 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 126

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

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

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

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200

5

ES 2 675 375 T3

130

135

140

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

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

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

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

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

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

<210> 127

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 127

ES 2 675 375 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15
Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30
Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45
Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60
Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80
Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
85 90 95
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr
100 105 110
His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140
Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160
Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175
Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190
Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205
Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220
Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 128

<211> 240

5 <212> PRT

ES 2 675 375 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 128

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

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

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

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

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

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

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

5 Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr

ES 2 675 375 T3

	115						120						125			
Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	
	130					135					140					
Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	
145					150					155					160	
Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	
				165					170					175		
Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	
			180					185					190			
Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	
		195					200					205				
Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	
	210					215					220					
Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys	
225					230					235					240	

<210> 129

<211> 234

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 129

ES 2 675 375 T3

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

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

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

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

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 130

<211> 18

5 <212> ADN

ES 2 675 375 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 130

5 ccaagggcta tggcggtc 18

<210> 131

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 131

ccgaagggtg acctggtc 18

<210> 132

15 <211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

20 <400> 132

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala

ES 2 675 375 T3

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

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

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134

<211> 116

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 134

ES 2 675 375 T3

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

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

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Val Ser Ser
115

<210> 135

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 135

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136

<211> 118

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223>

Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 136

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

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

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

10

ES 2 675 375 T3

<210> 137

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 137

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

<210> 138

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

15 <400> 138

ES 2 675 375 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 139

<211> 106

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 139

ES 2 675 375 T3

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

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

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

Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Tyr Pro Pro Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 140

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 140

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile

ES 2 675 375 T3

35

40

45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

ser Gly ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 141

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 141

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
85 90 95

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

Lys

10 <210> 142

<211> 113

ES 2 675 375 T3

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

5 <400> 142

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

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

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

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

Lys

<210> 143

<211> 112

<212> PRT

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 143

ES 2 675 375 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

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

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

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

<210> 144

<211> 113

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 144

ES 2 675 375 T3

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

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

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln
85 90 95

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

Lys

<210> 145

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 145

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30

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

ES 2 675 375 T3

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90
 Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys

<210> 146

<211> 107

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Traducción del producto de PCR

<400> 146

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

10 <210> 147

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

ES 2 675 375 T3

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Ácido nucleico de codón optimizado

<400> 147

```

cgtacggtgg ccgctcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc      60
ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag     120
tgaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac     180
agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag     240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag     300
agcttcaaca ggggcgagtg ctag                                             324
    
```

5 <210> 148

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Proteína de codón optimizado

<400> 148

```

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

<210> 149

<211> 981

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

ES 2 675 375 T3

<223> Descripción de secuencia artificial: Ácido nucleico de codón optimizado

<400> 149

```

ggcccaagcg tgttccccct ggccccagc agcaagagca ccagcggcgg cacagccgcc      60
ctgggctgcc tggggaagga ctacttcccc gagcccgtga ccgtgagctg gaacagcggga    120
gccctgacct ccggcgtgca caccttcccc gccgtgctgc agagcagcgg cctgtacagc    180
ctgagcagcg tggtgaccgt gcccagcagc agcctgggca cccagaccta catctgcaac    240
gtgaaccaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag tggagcccaa gagctgcgac    300
aagaccaca cctgcccccc ctgcccagcc ccagagctgc tgggcggacc cagcgtgttc    360
ctgttcccc ccaagcccaa ggacaccctg atgatcagca ggacccccga ggtgacctgc    420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaggacca gaggtgaagt tcaactggta cgtggacggc    480
gtggaggtgc acaacgcaa gaccaagccc agagaggagc agtacaacag cacctacagg    540
gtggtgtccg tgctgaccgt gctgcaccag gactggctga acggcaagga atacaagtgc    600
aaggtctcca acaaggccct gccagcccc atcgaaaaga ccatcagcaa ggccaagggc    660
cagccacggg agccccaggt gtacaccctg cccccagcc gggaggagat gaccaagaac    720
caggtgtccc tgacctgtct ggtgaagggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg    780
gagagcaacg gccagcccga gaacaactac aagaccacc cccagtgct ggacagcgcac    840
ggcagcttct tcctgtacag caagctgacc gtggacaagt ccaggtggca gcagggcaac    900
gtgttcagct gcagcgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacca gaagtccctg    960
agcctgagcc ccggcaagta g                                             981

```

5 <210> 150

<211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de secuencia artificial: Proteína de codón optimizado

<400> 150

ES 2 675 375 T3

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

ES 2 675 375 T3

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

<210> 151

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 151

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

<210> 152

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 152

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

10 <210> 153

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Epítopo

<400> 153

Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu
 1 5 10 15

<210> 154

<211> 15

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epítopo

<400> 154

Pro Val Thr Ala Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys
 1 5 10 15

25 <210> 155

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

30 <220>

<223> Epítopo

<400> 155

Val Phe Asn Tyr Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser
 1 5 10 15

ES 2 675 375 T3

<210> 156

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

<223> Epitopo

<400> 156

Gln Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr
1 5 10 15

<210> 157

10 <211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Epitopo

15 <400> 157

Arg Ser Cys Val Arg Glu Ser Ser Gly Phe Thr Glu Cys Arg Gly
1 5 10 15

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLD18A2 y de mediar en la muerte y/o inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18A2, en donde dicho anticuerpo es para usar en un método para prevenir o tratar un tumor de Krukenberg, en donde dicha CLD18A2 es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos según la SEQ ID NO: 2.
2. Un anticuerpo para uso de la reivindicación 1, en donde dicho anticuerpo se une a CLD18A1 y CLD18A2, o se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1, en donde dicha CLD18A1 es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID NO: 8 y dicha CLD18A2 es un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.
- 10 3. El anticuerpo para uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicha muerte de células y/o la inhibición de la proliferación se induce mediante la unión de dicho anticuerpo a CLD18A2 expresada por dichas células.
4. El anticuerpo para uso de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicho anticuerpo media dicha eliminación de células induciendo lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica y/o fagocitosis, preferiblemente induciendo lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.
- 15 5. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, quimérico, humano o humanizado, o un fragmento de un anticuerpo.
6. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgA secretora, una IgD y un anticuerpo IgE.
- 20 7. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho anticuerpo comprende una combinación de VH y VL que comprende cada uno un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de las siguientes (i) a (ix):
- 25 (i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de SEQ ID NO: 115, VL: CDR1: posiciones 49-53 de SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de SEQ ID NO: 122,
- (ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 116, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 121,
- 30 (iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de SEQ ID NO: 117, VL: CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 123,
- (iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de SEQ ID NO: 119, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de SEQ ID NO: 126,
- 35 (v) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 118, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 118, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 118, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 125, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 125, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 125,
- (vi) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 124, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 124, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 124,
- 40 (vii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 127, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 127, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 127,
- 45 (viii) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 128, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 128, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 128, y
- (ix) VH: CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120, VL: CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 129, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 129, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 129.
- 50 8. El anticuerpo para uso de la reivindicación 7, en donde dicho anticuerpo comprende una combinación de cadenas pesadas y cadenas livianas seleccionadas de las siguientes posibilidades (i) a (ix):

- (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 115 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 122,
- (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 116 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 121,
- 5 (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 117 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 123,
- (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 119 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 126,
- 10 (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 118 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 125,
- (vi) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 120 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 124,
- (vii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 127,
- 15 (viii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 120 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 128, y
- (ix) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 120 y la cadena liviana comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 129.
- 20 9. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde dicho anticuerpo se une a epítomos nativos de la CLD18A2 presentes en la superficie de células vivas.
10. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en donde dicha CLD18A2 se expresa en la superficie de dichas células.
11. El anticuerpo para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde dicho anticuerpo se puede obtener mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que
- 25 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23, 26-31, 151, 153 y 155-157, o un fragmento inmunogénico o derivado del mismo, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico del mismo.
12. Un anticuerpo producido por un clon depositado bajo el No. de acceso DSM ACC2737, DSM ACC2738, DSM ACC2739, DSM ACC2740, DSM ACC2741, DSM ACC2742, DSM ACC2743, DSM ACC2745, DSM ACC2746, DSM ACC2747, DSM ACC2748, DSM ACC2808, DSM ACC2809, o DSM ACC2810, en donde dicho anticuerpo se utilizará
- 30 en un método para prevenir o tratar un tumor de Krukenberg.
13. Un conjugado que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 acoplado a un agente terapéutico, preferiblemente una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico, en donde dicho conjugado se usa en un método para prevenir o tratar un tumor de Krukenberg.
- 35 14. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 y/o un conjugado de acuerdo con la reivindicación 13, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha composición farmacéutica es para usar en un método para prevenir o tratar un tumor de Krukenberg.

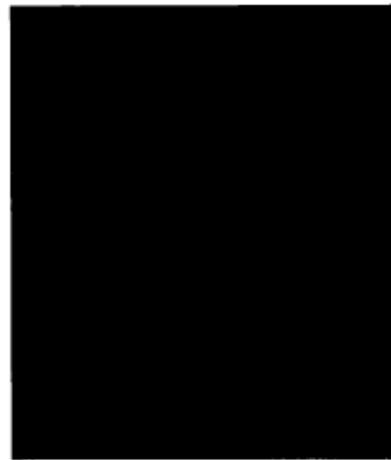
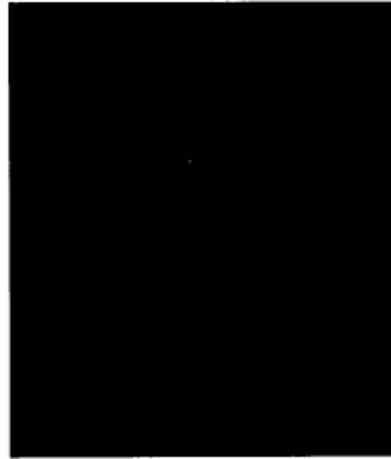
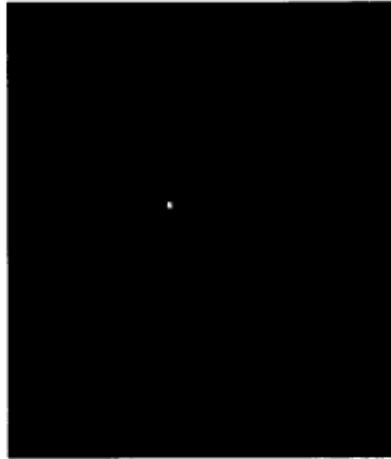


Fig. 1

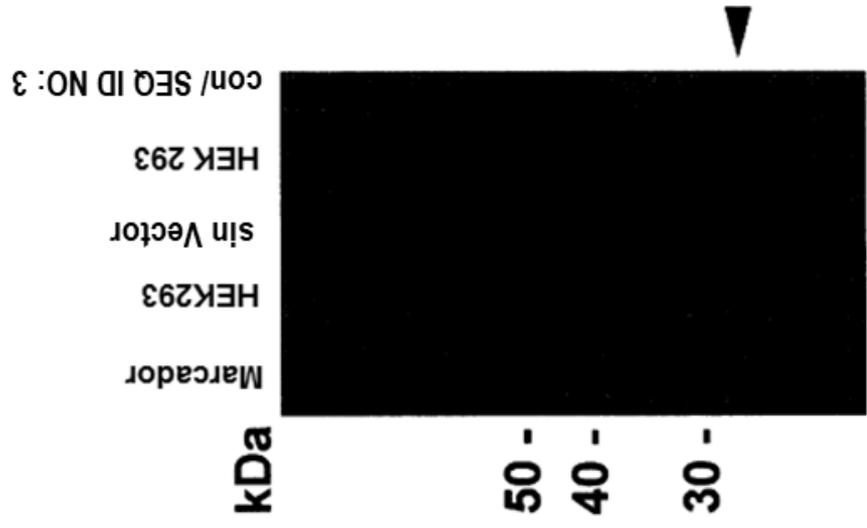


Fig. 2

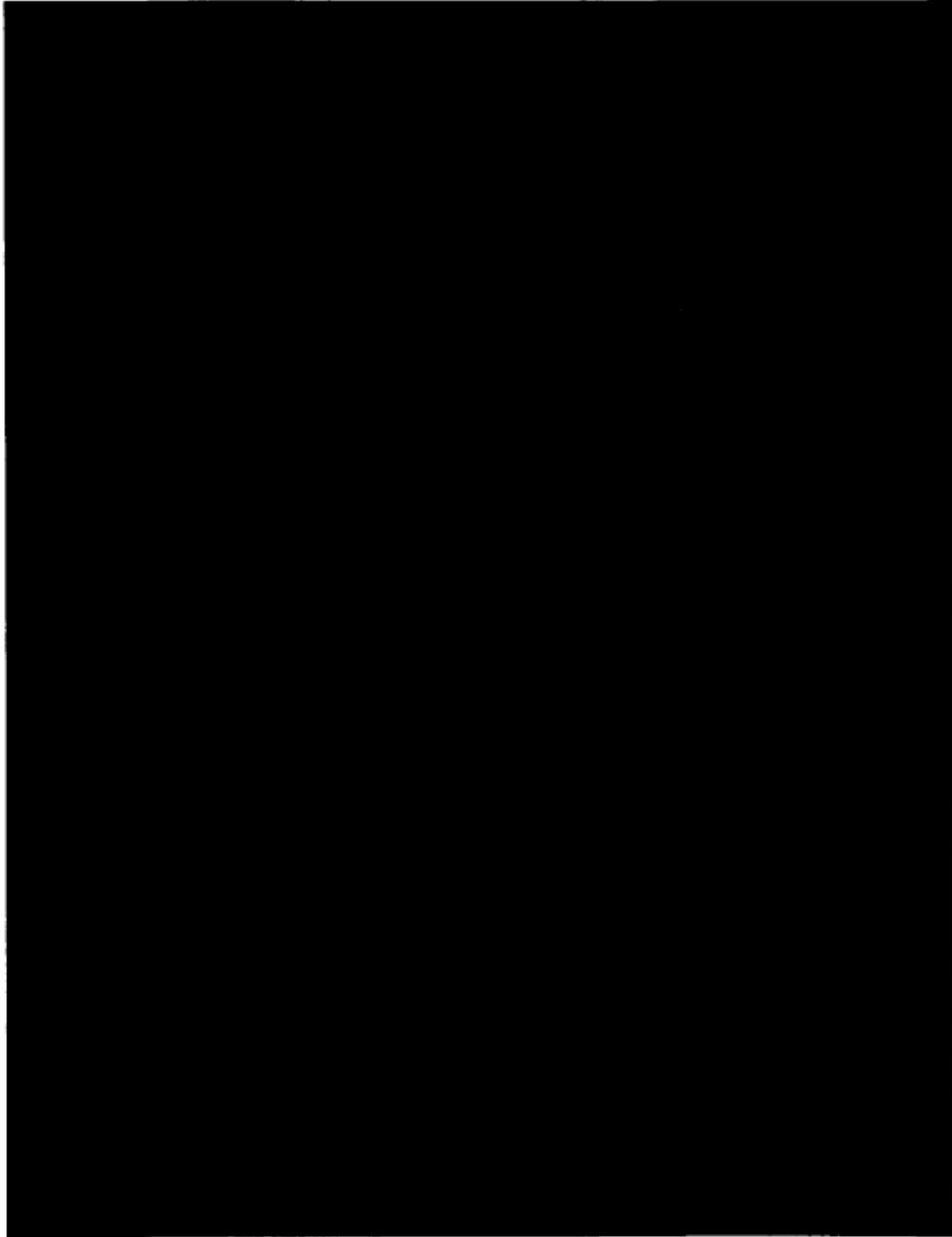


Fig. 3

Fig. 4

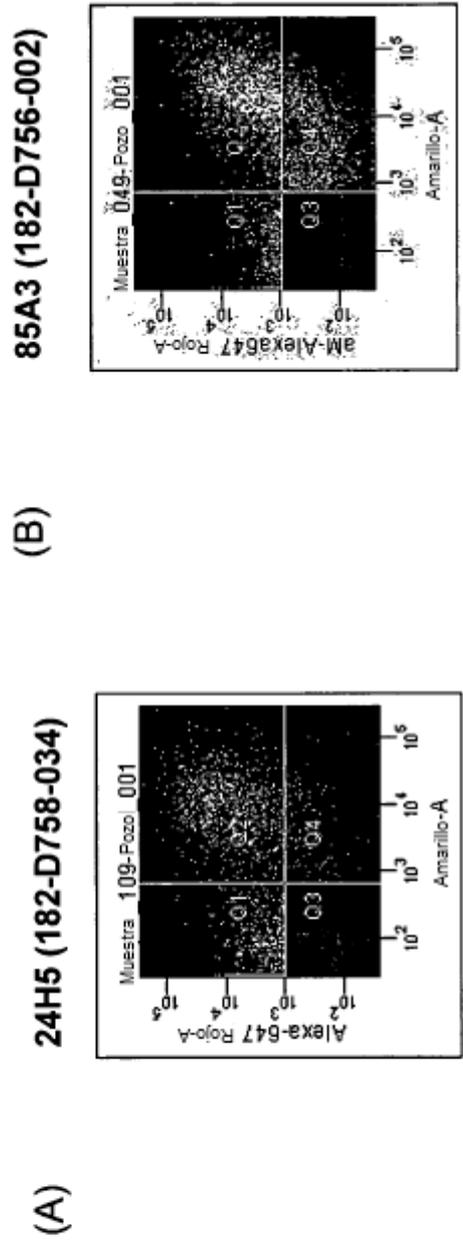


Fig. 4C

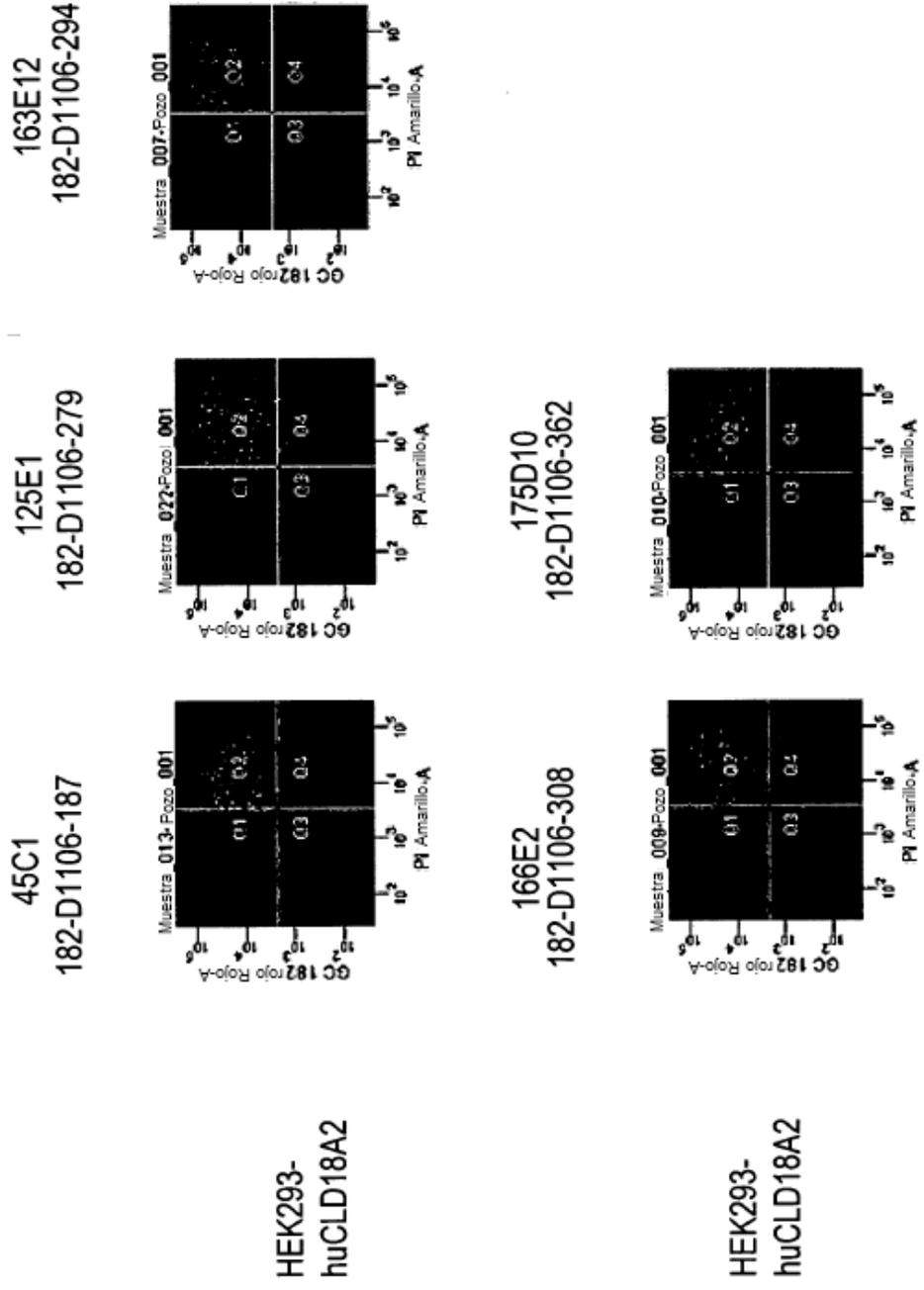


Fig. 5

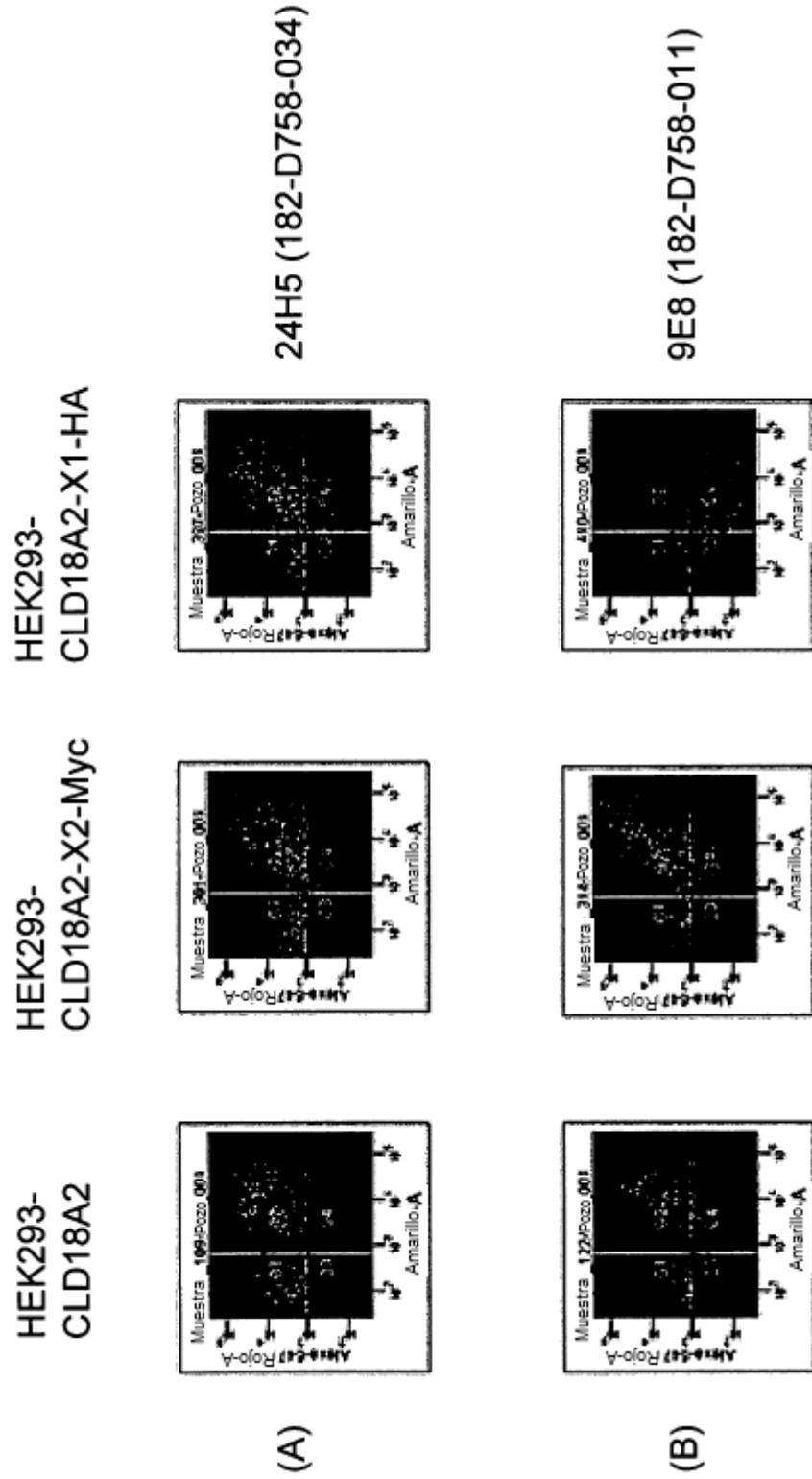


Fig. 5

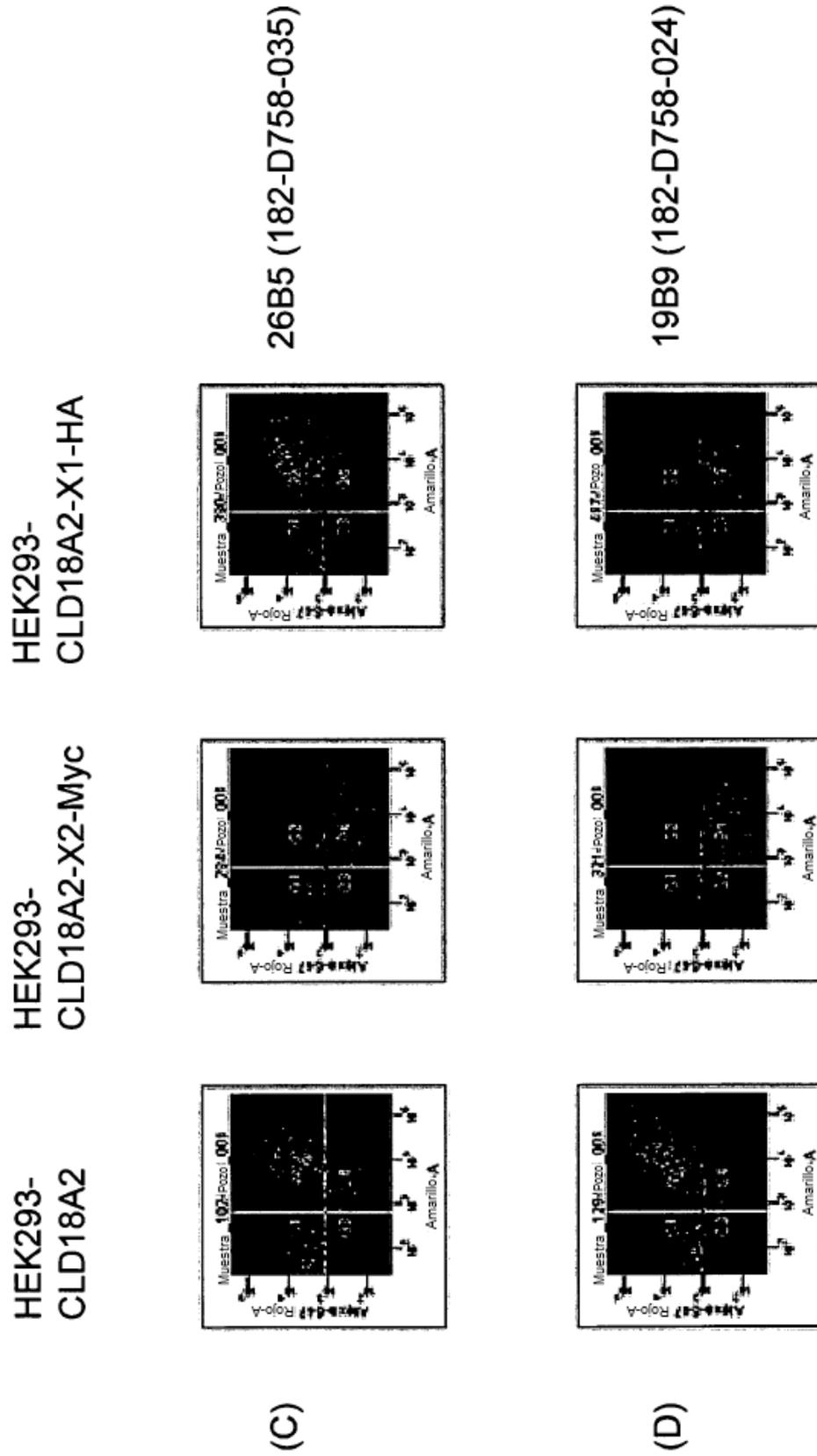


Fig. 6A

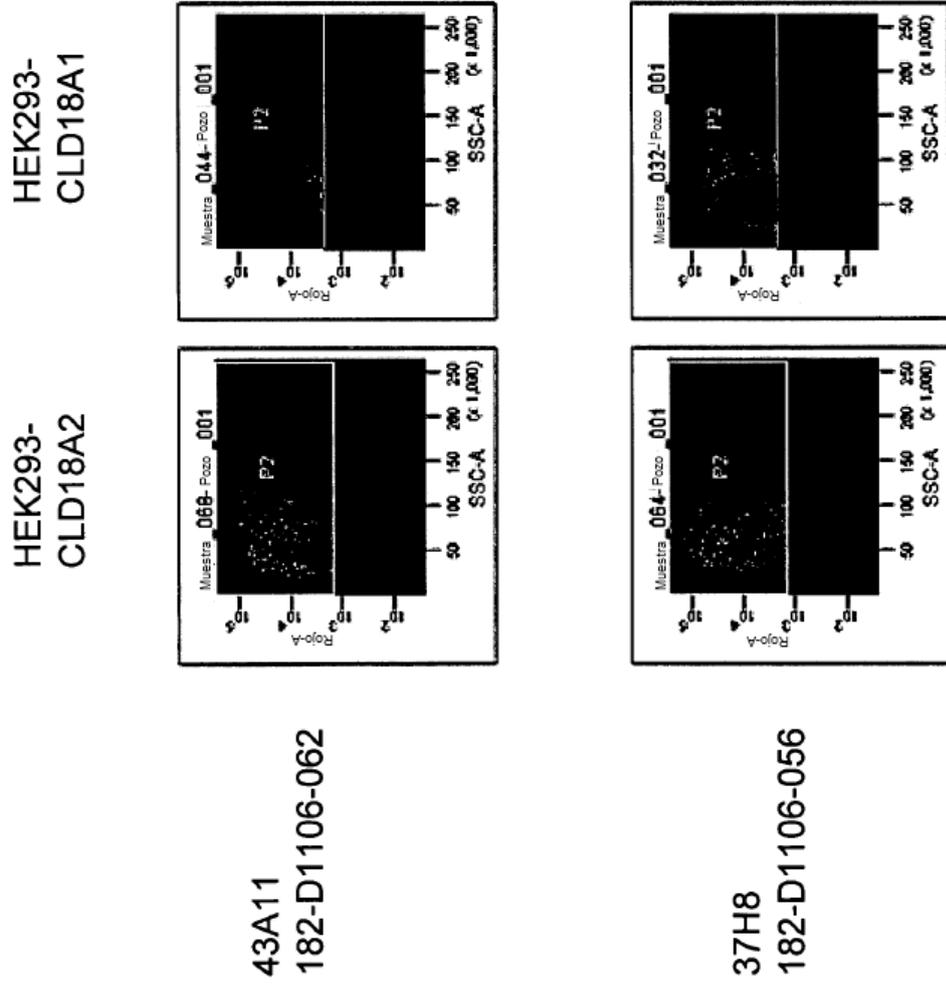
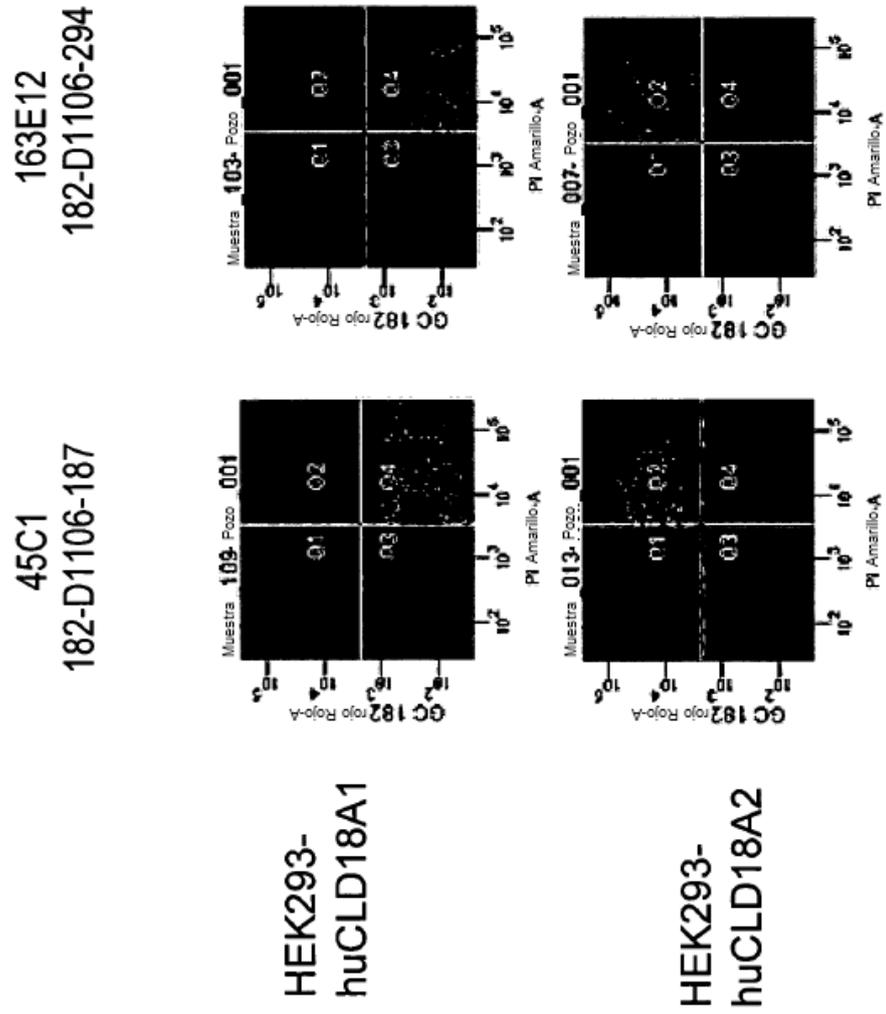


Fig. 6B



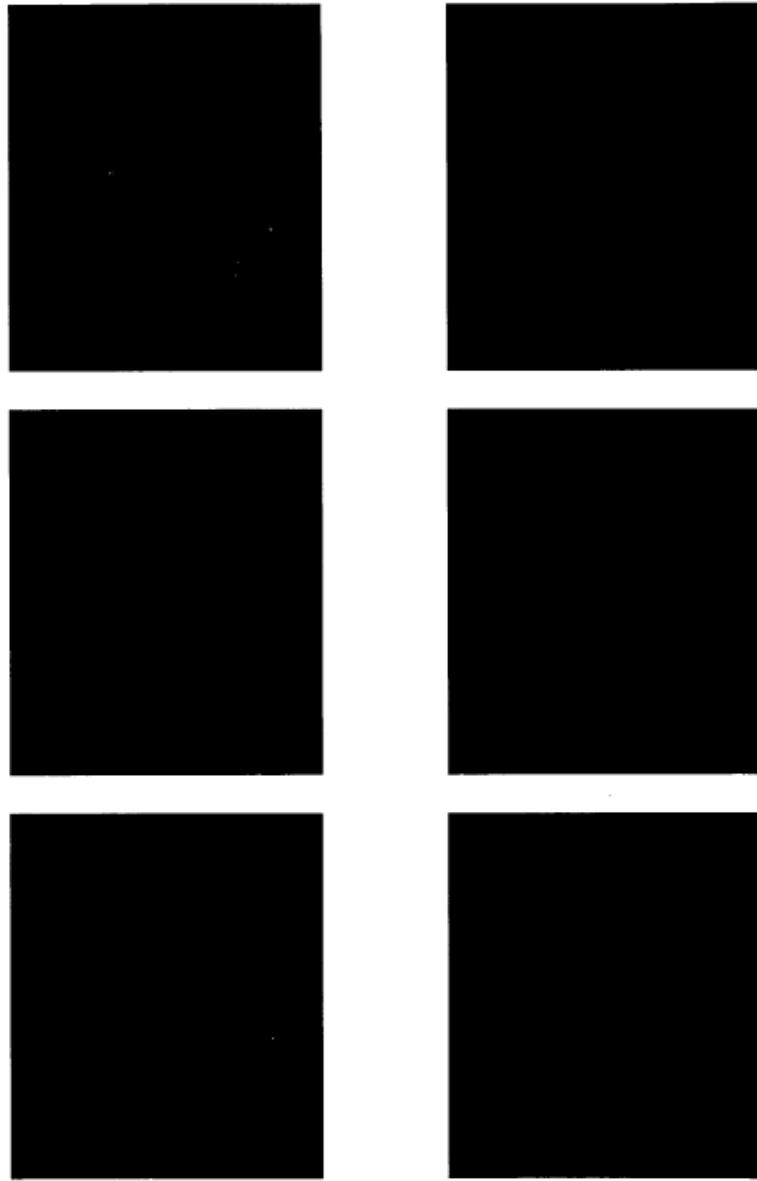


Fig. 7

(A)

(B)

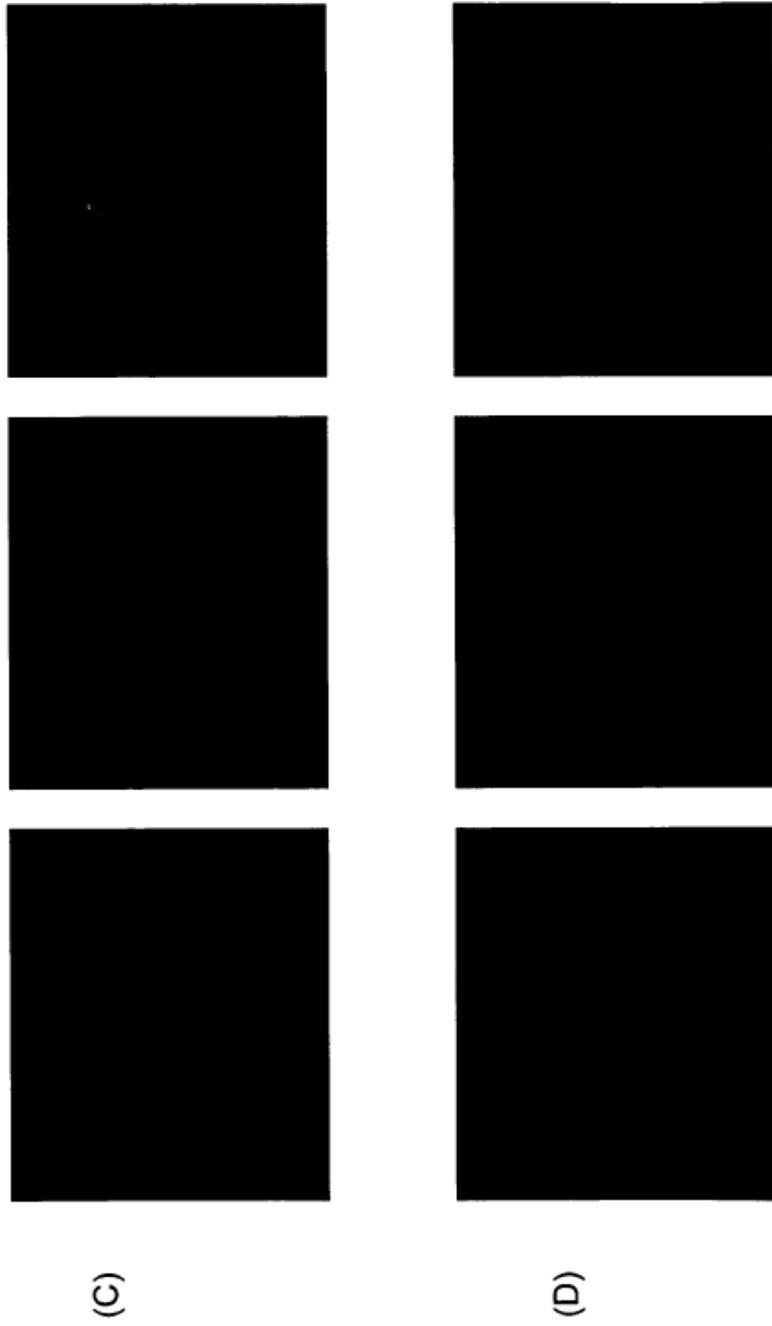
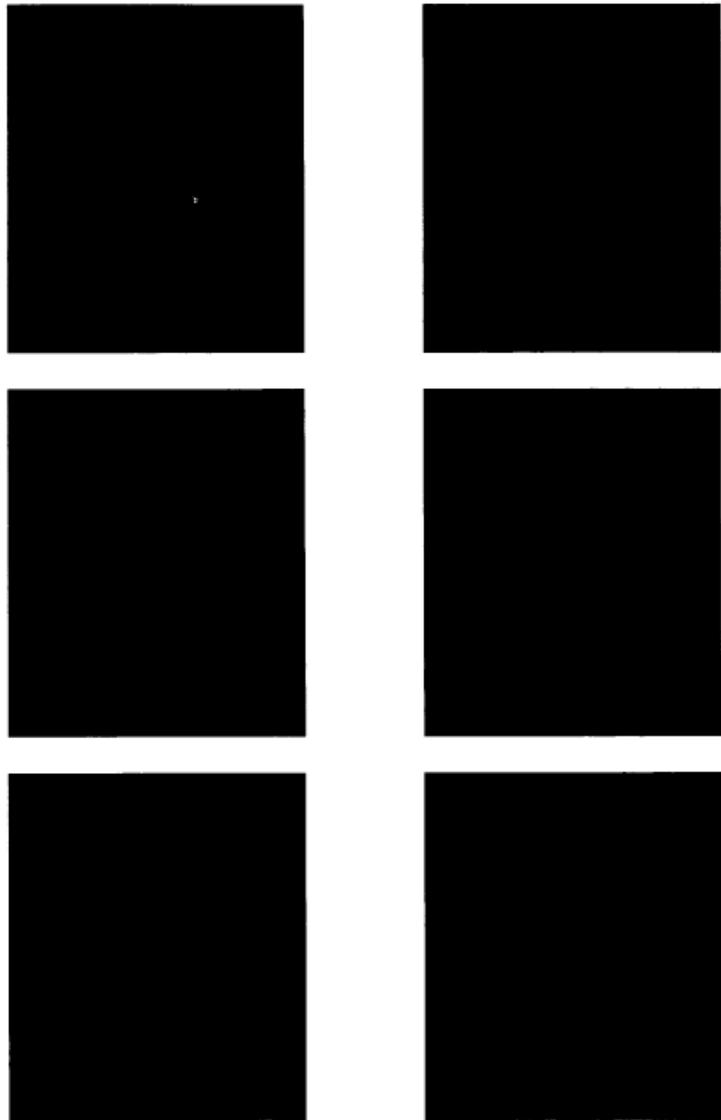


Fig. 7



(A)

(B)

Fig. 8

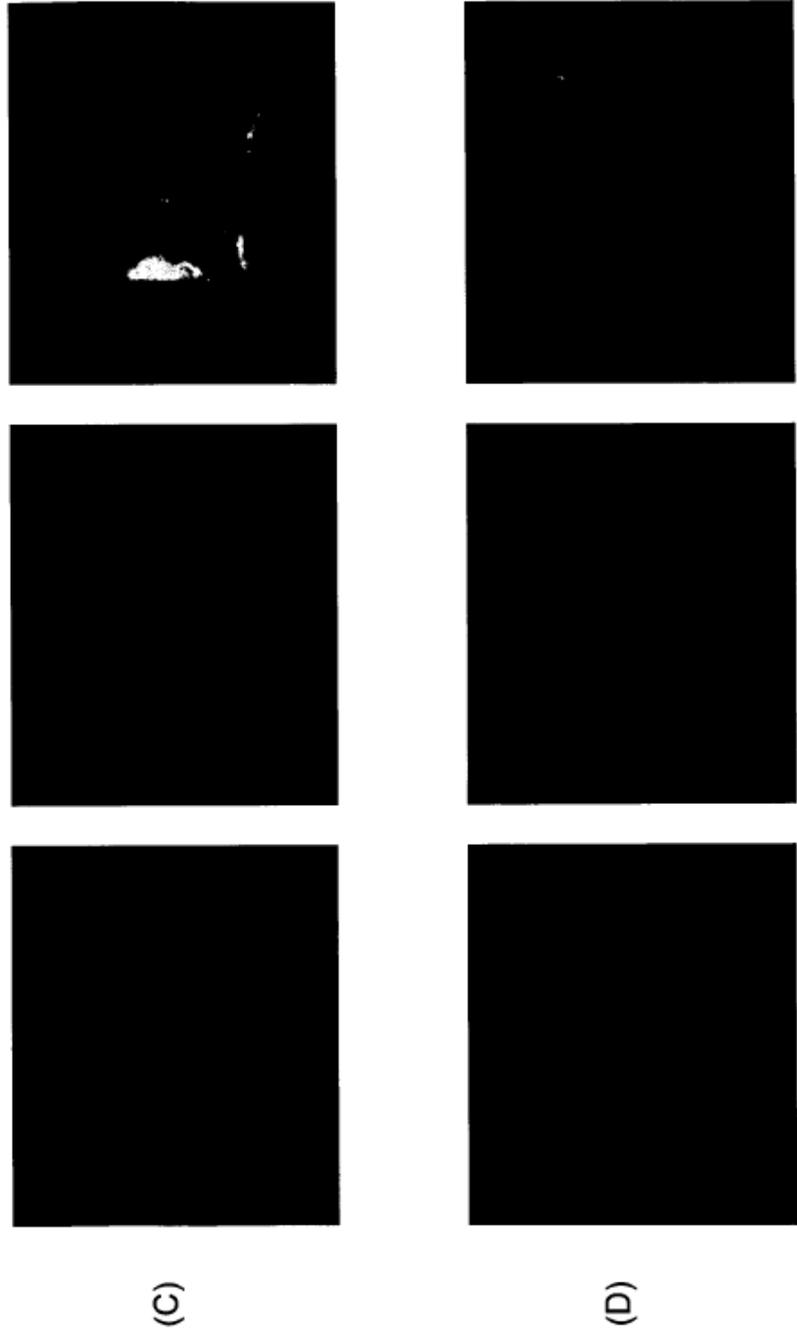


Fig. 8

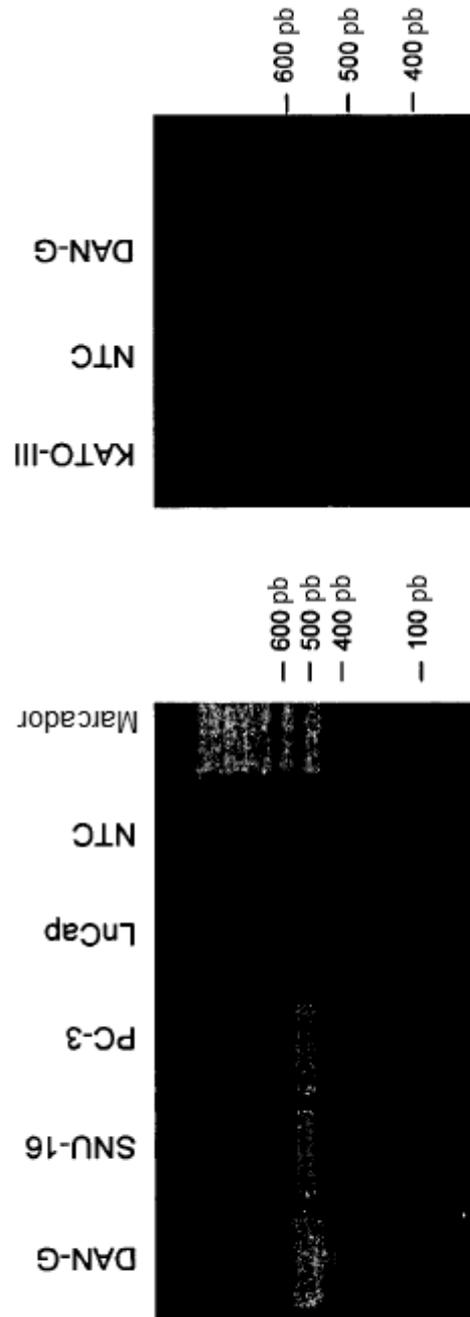


Fig. 9

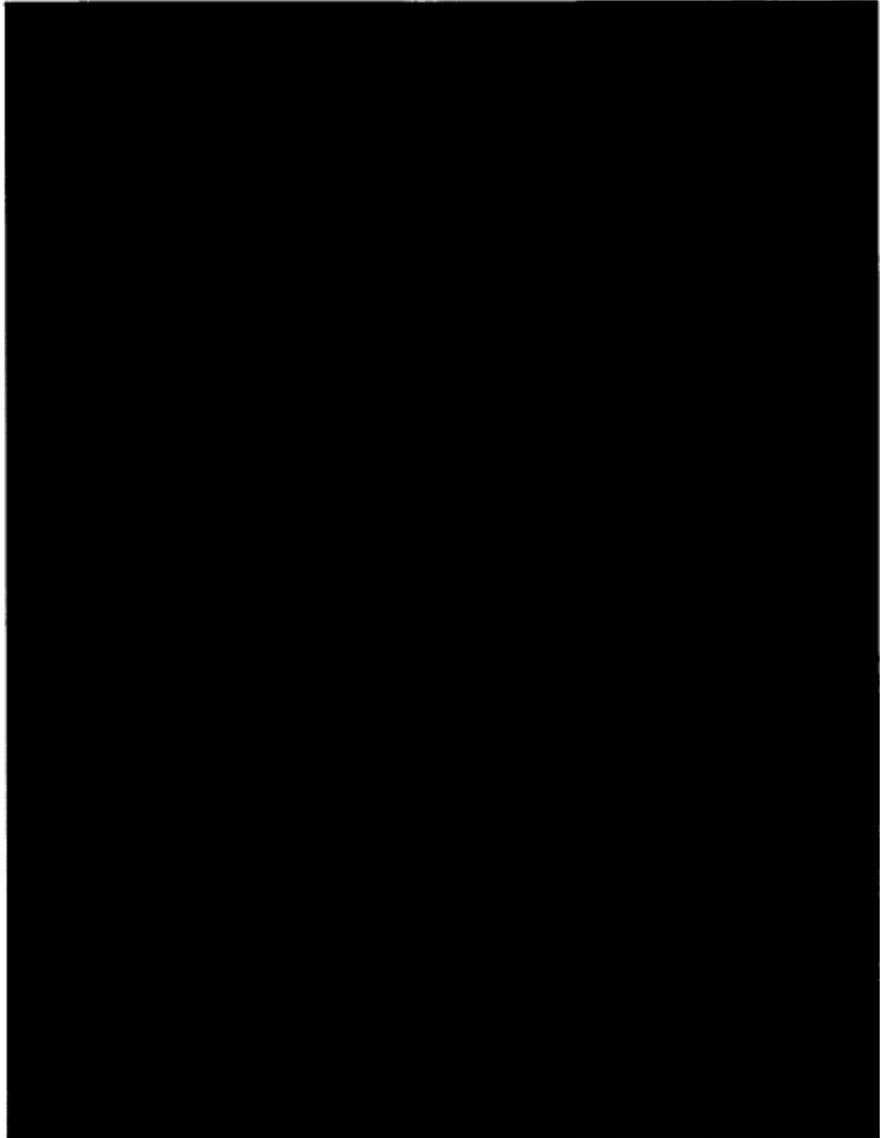


Fig. 10

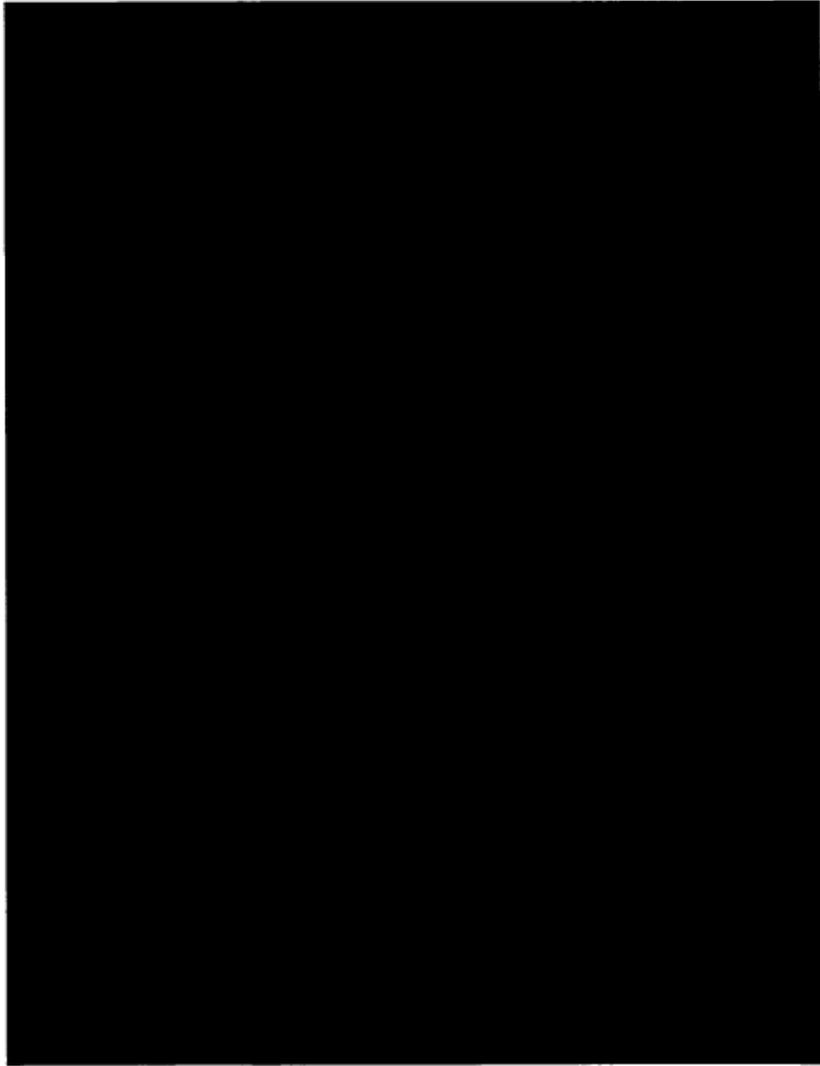


Fig. 11

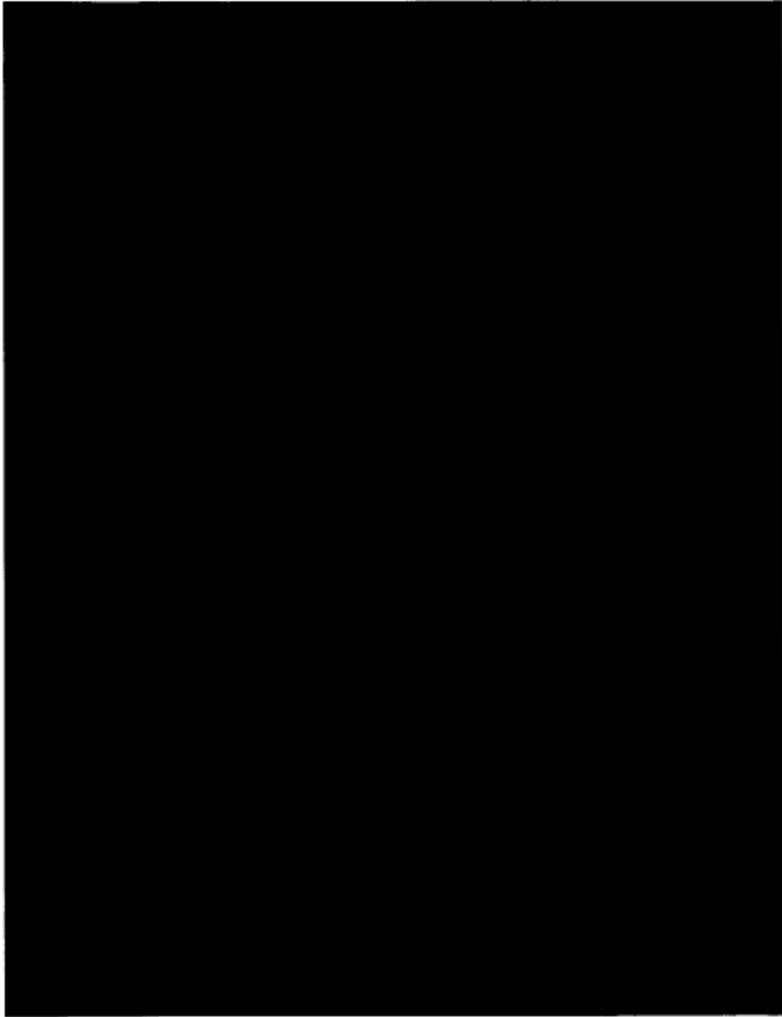


Fig. 12A

Fig. 12B



Fig. 13

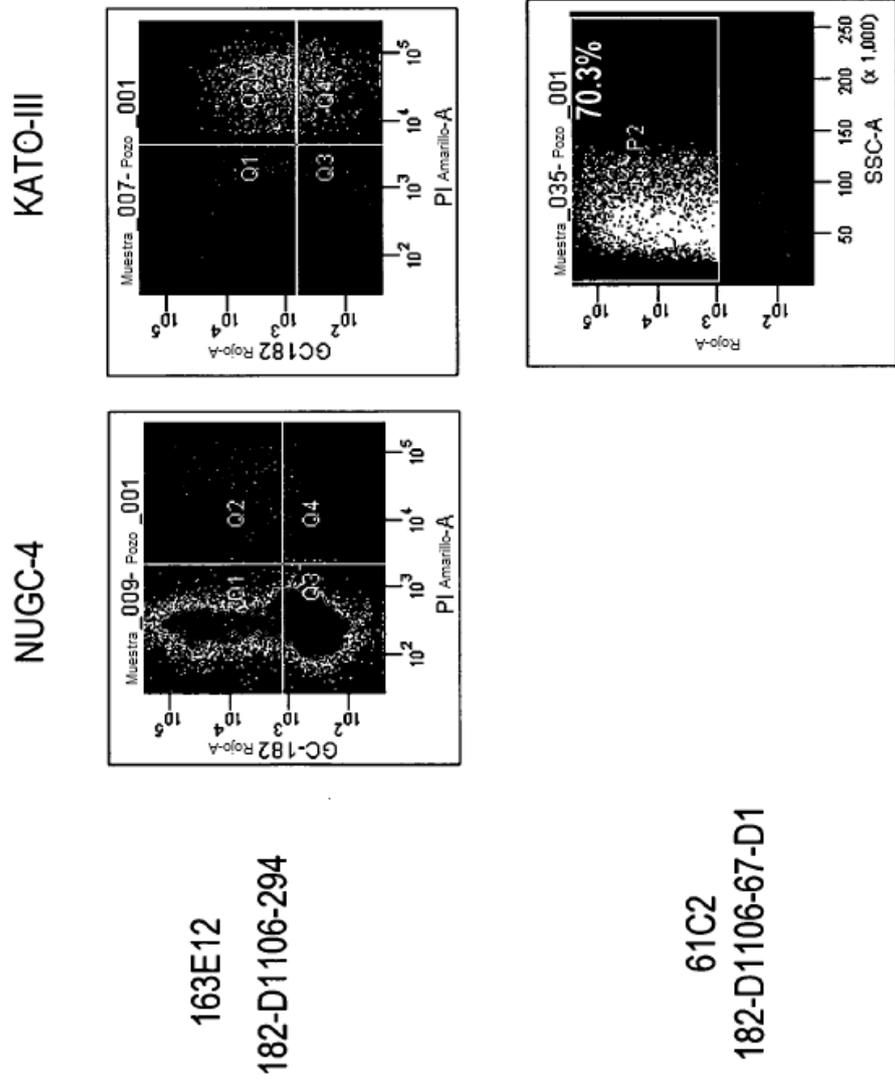


Fig. 15A

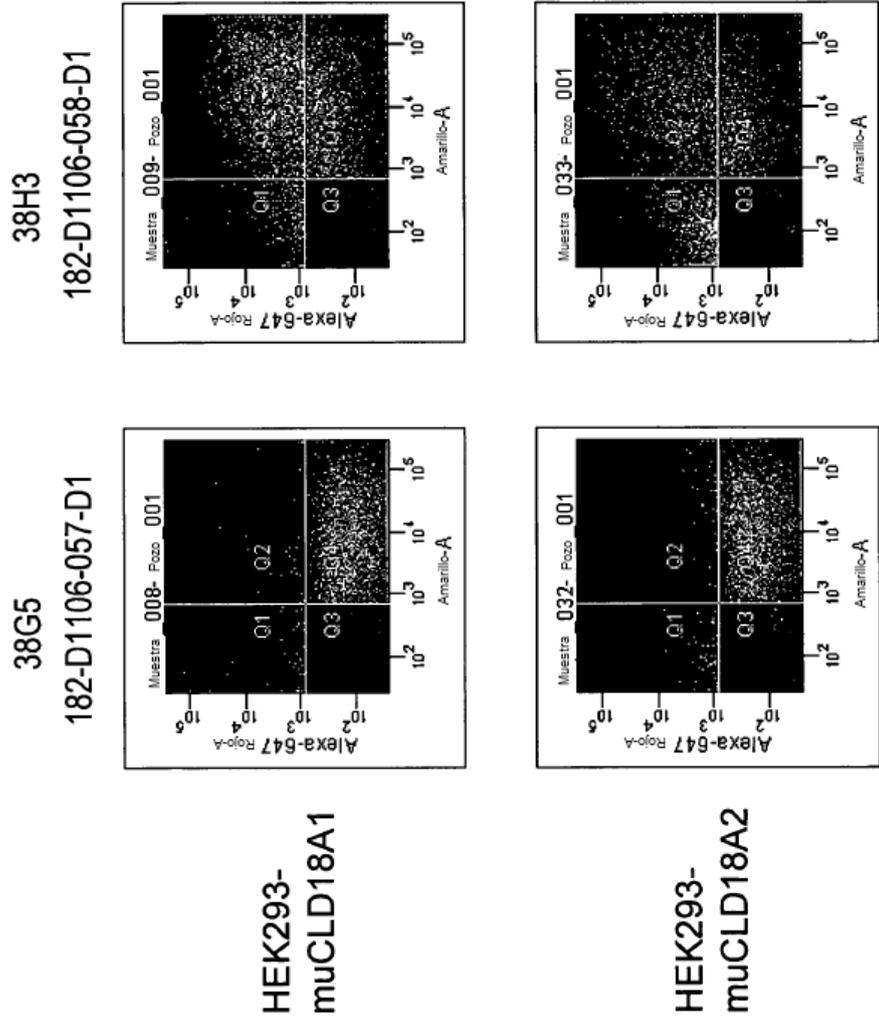


Fig. 15B

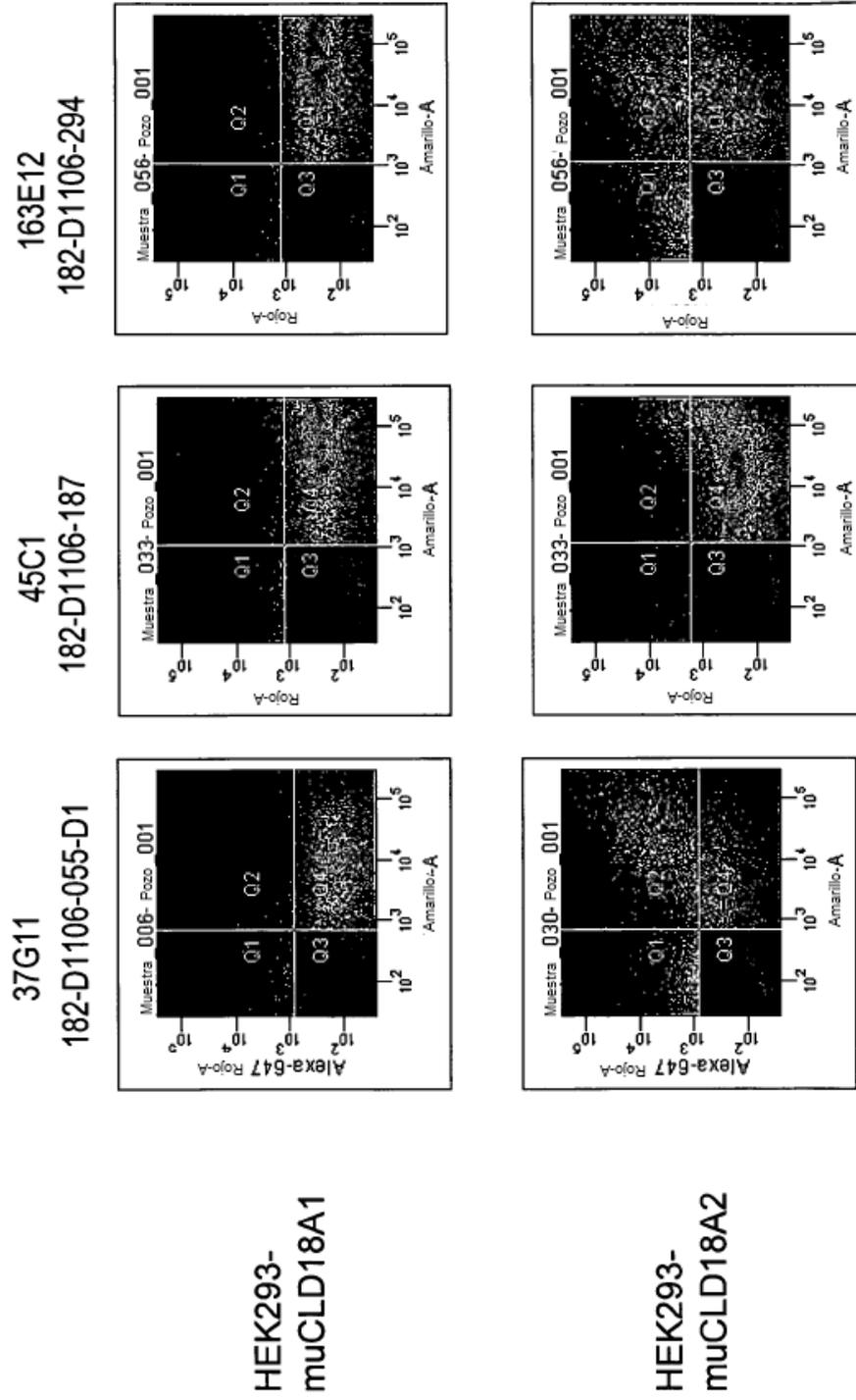
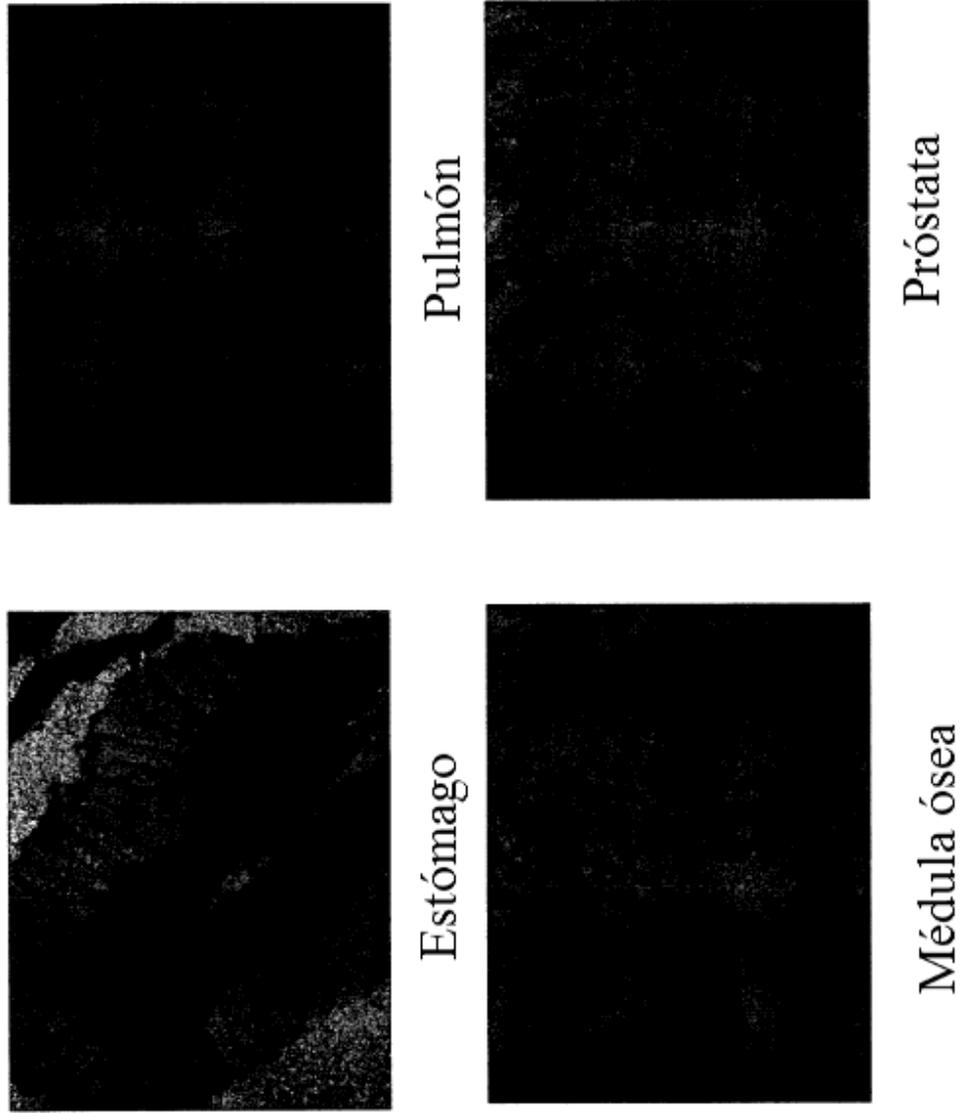


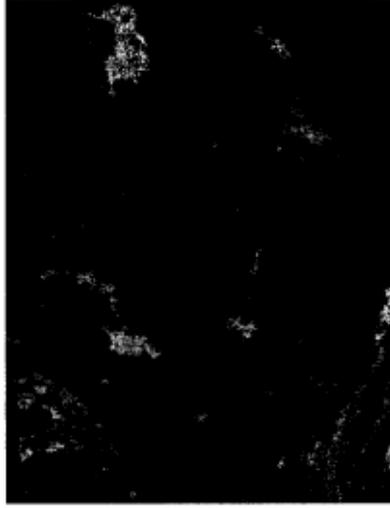
Fig. 16



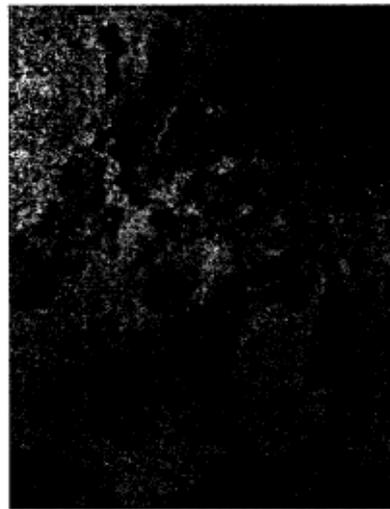
(A)

Fig. 16

Carcinomas de estómago



(B)



Carcinomas de pulmón

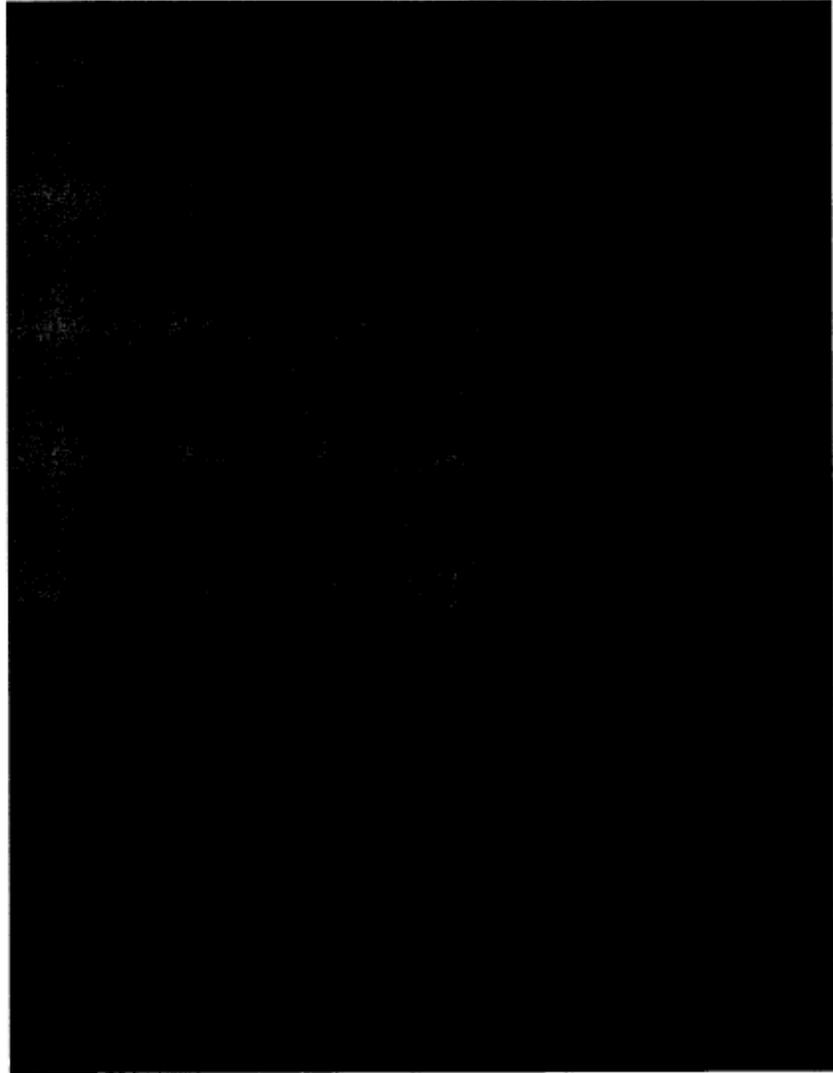


Fig. 16

(c)

Fig. 17

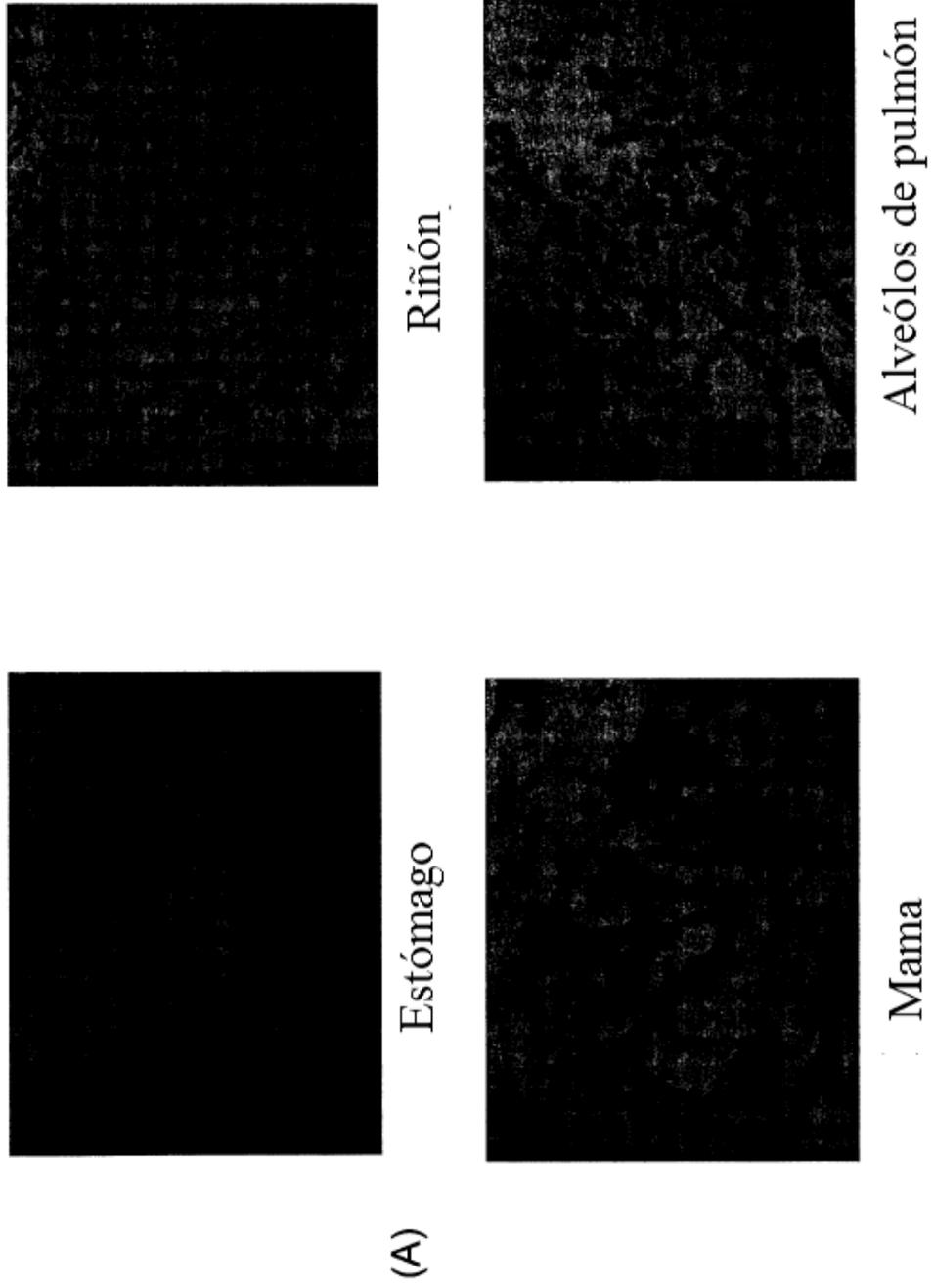


Fig. 17

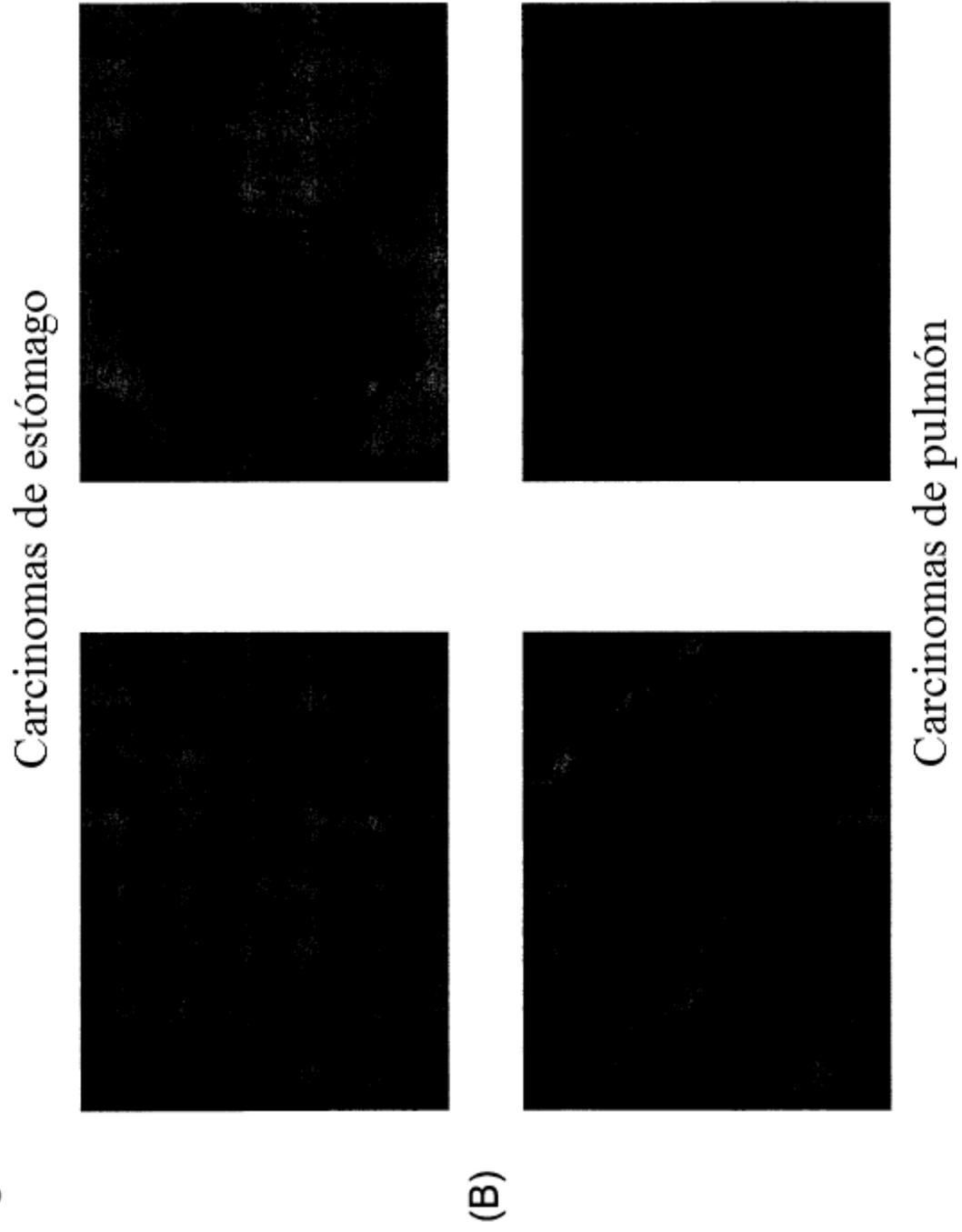
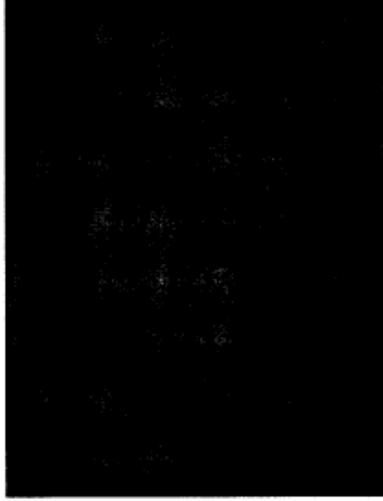
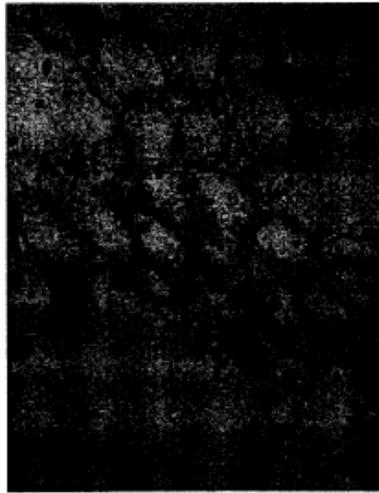


Fig. 18A

Estómago normal



Carcinomas de estómago



Fig. 18B

Hek293- simulado



Cáncer gástrico



Hek293-GC182A2



Cáncer gástrico

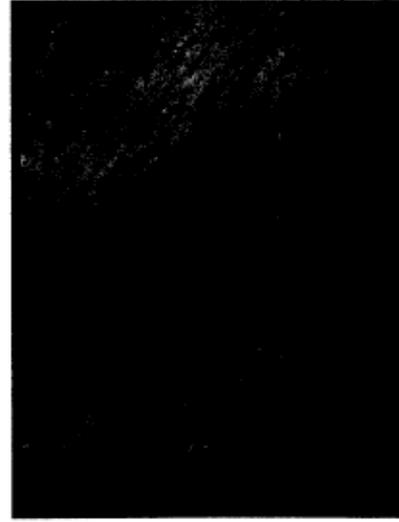


Fig. 18C

Hek293-GC182A2



Hek293- simulado

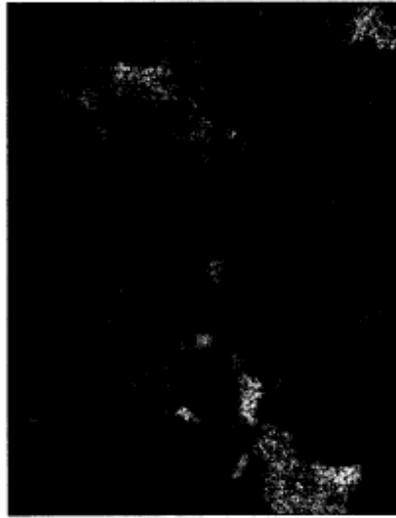


Cáncer gástrico



Fig. 18D

Hek293-GC182A2



Hek293-simulado



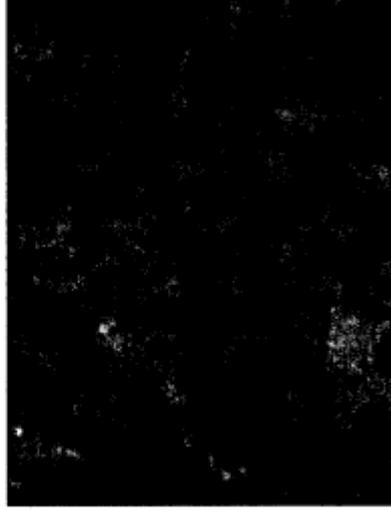
Cáncer gástrico

Fig. 18E

Hek293-GC182A2



Hek293-simulado



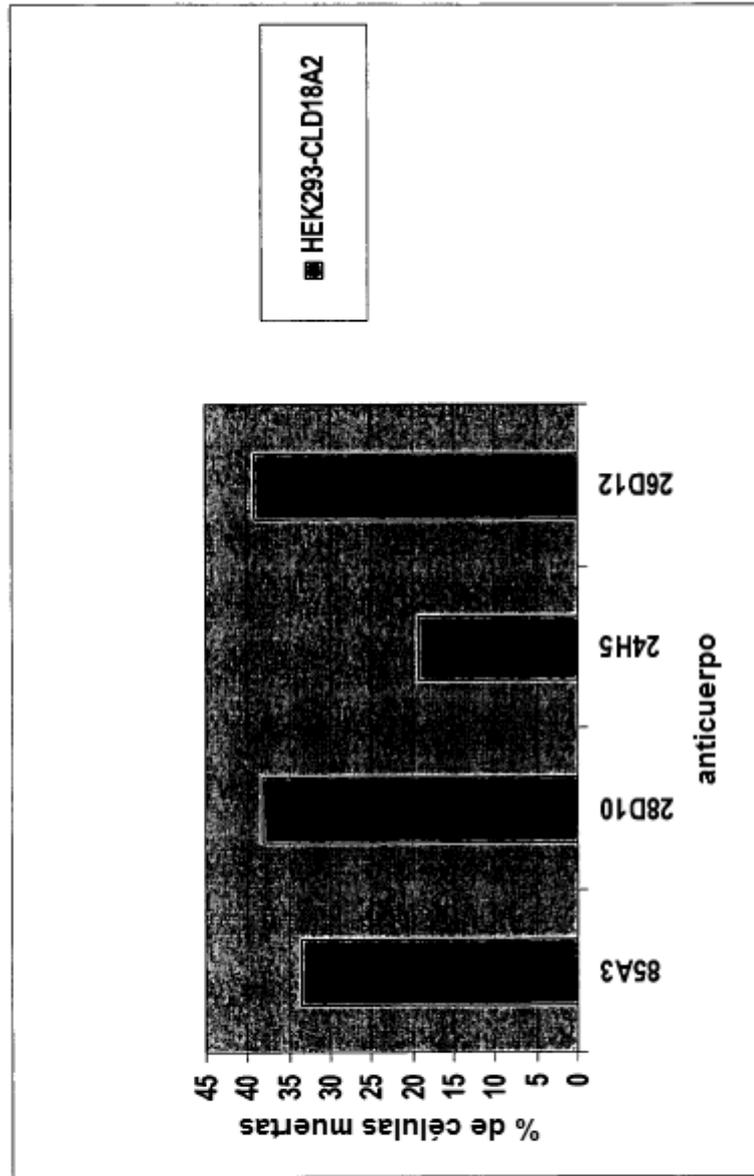


Fig. 19

Fig. 20

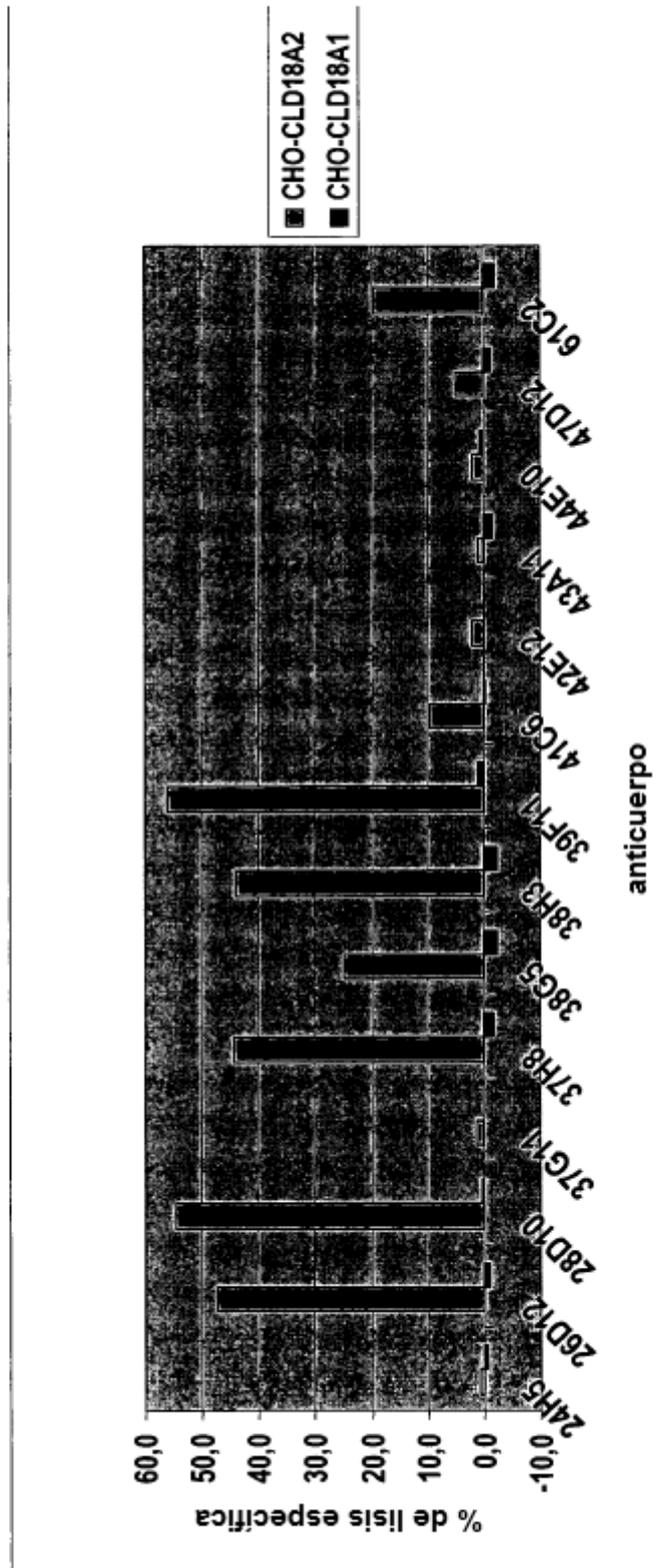


Fig. 21

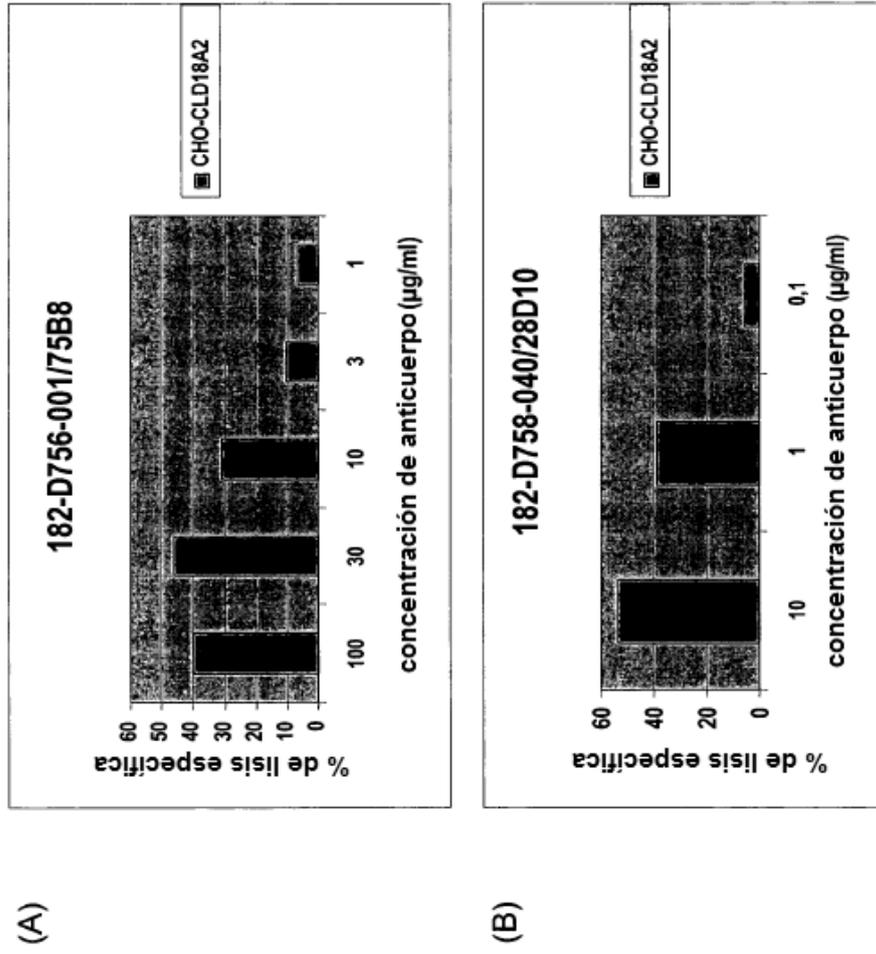


Fig. 21

(C)

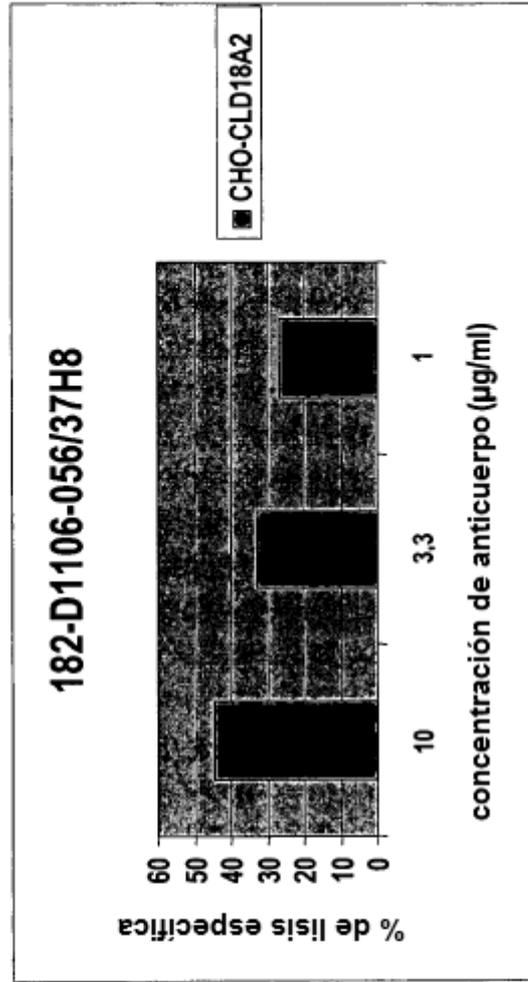


Fig. 22

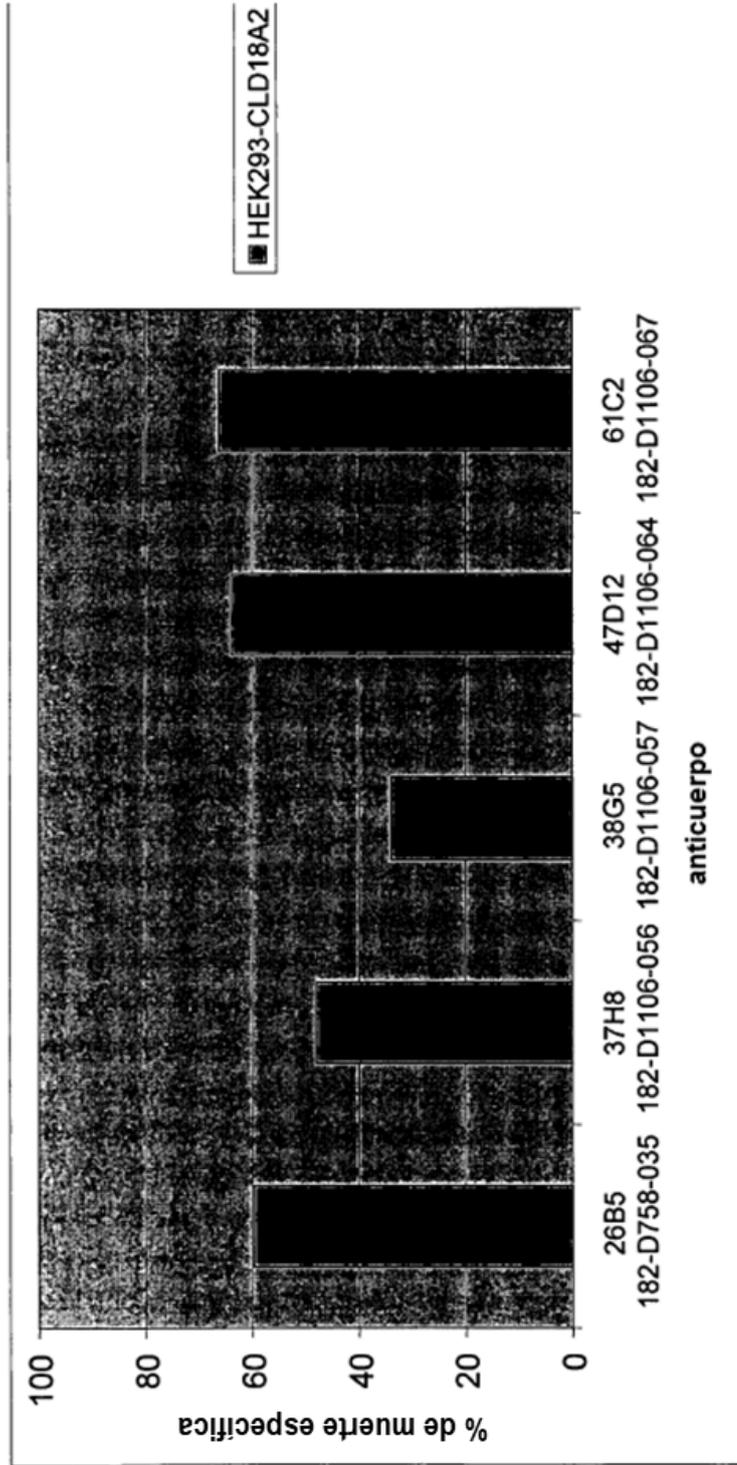


Fig. 23

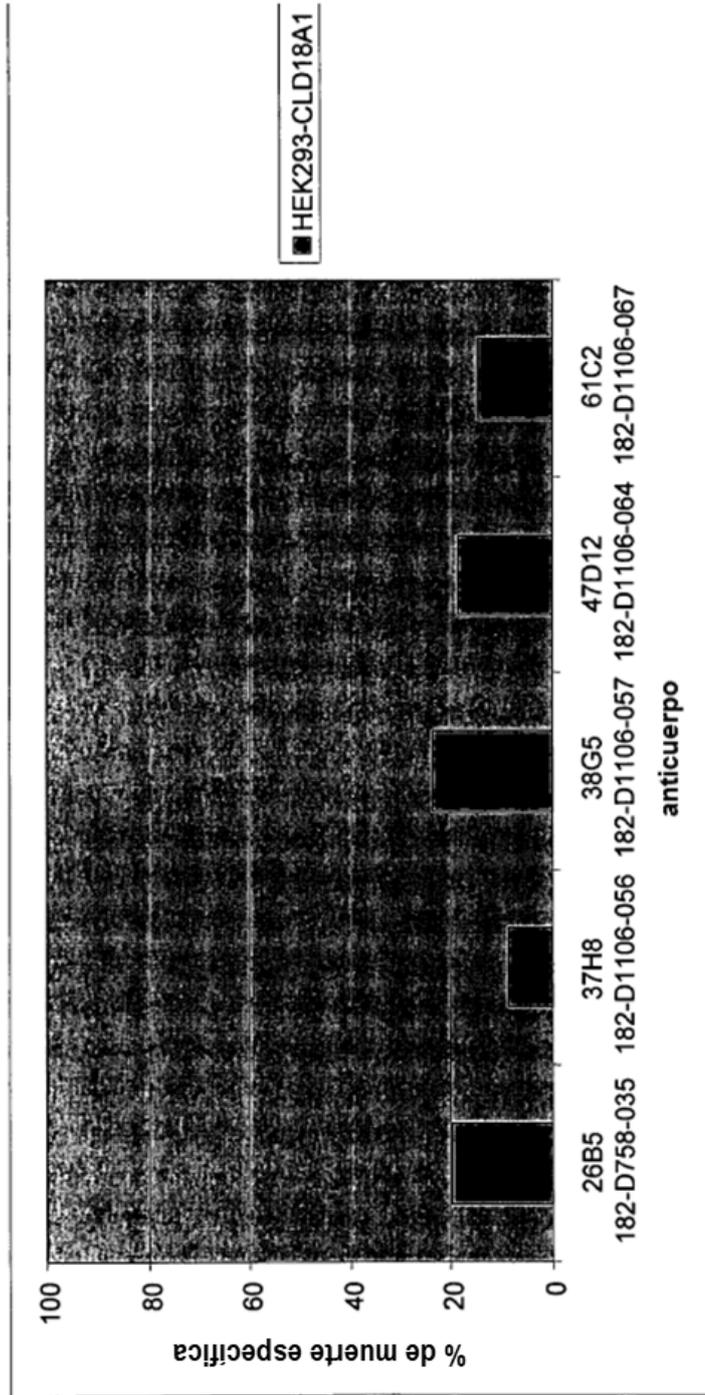


Fig. 24

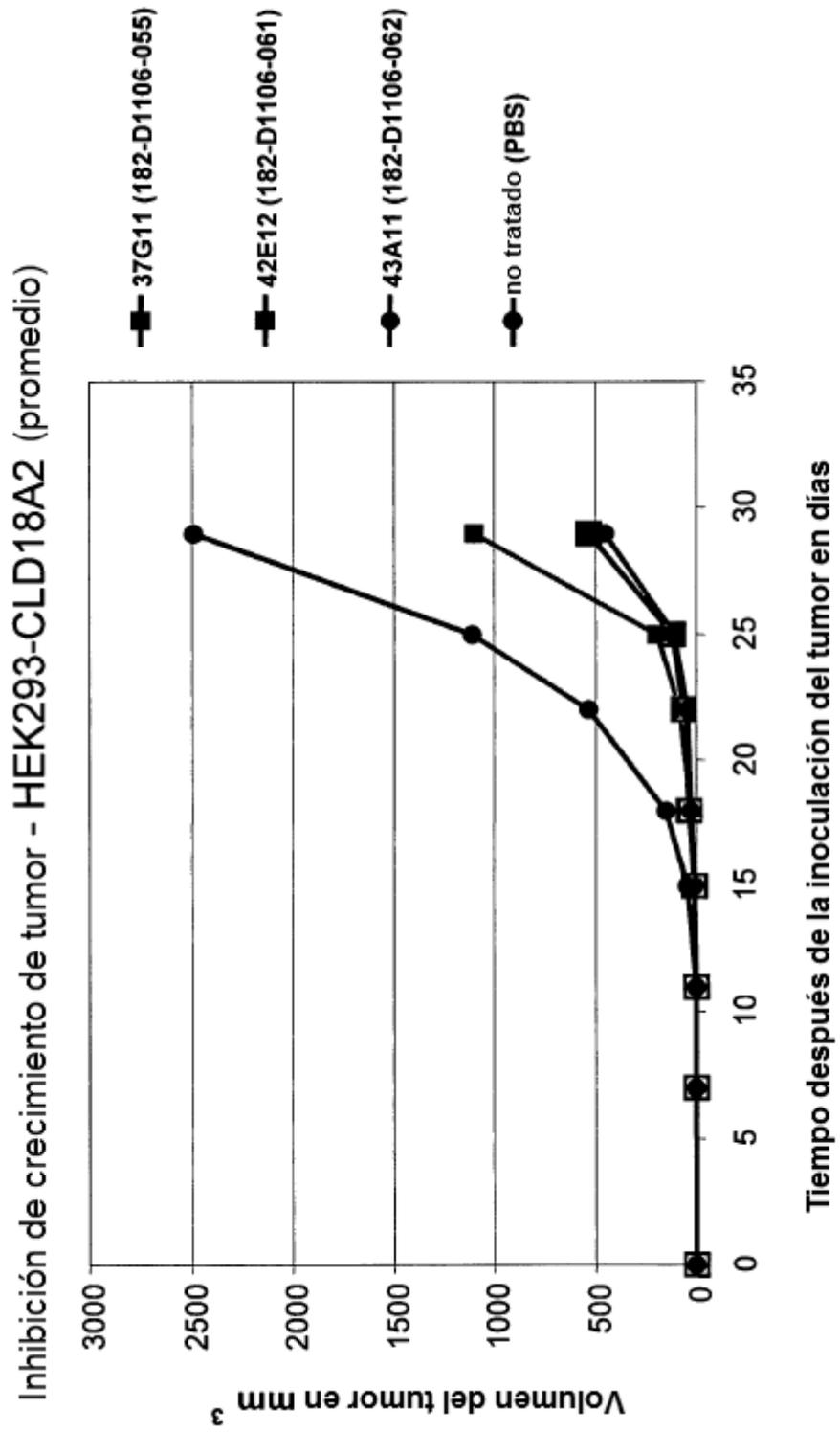


Fig. 25A

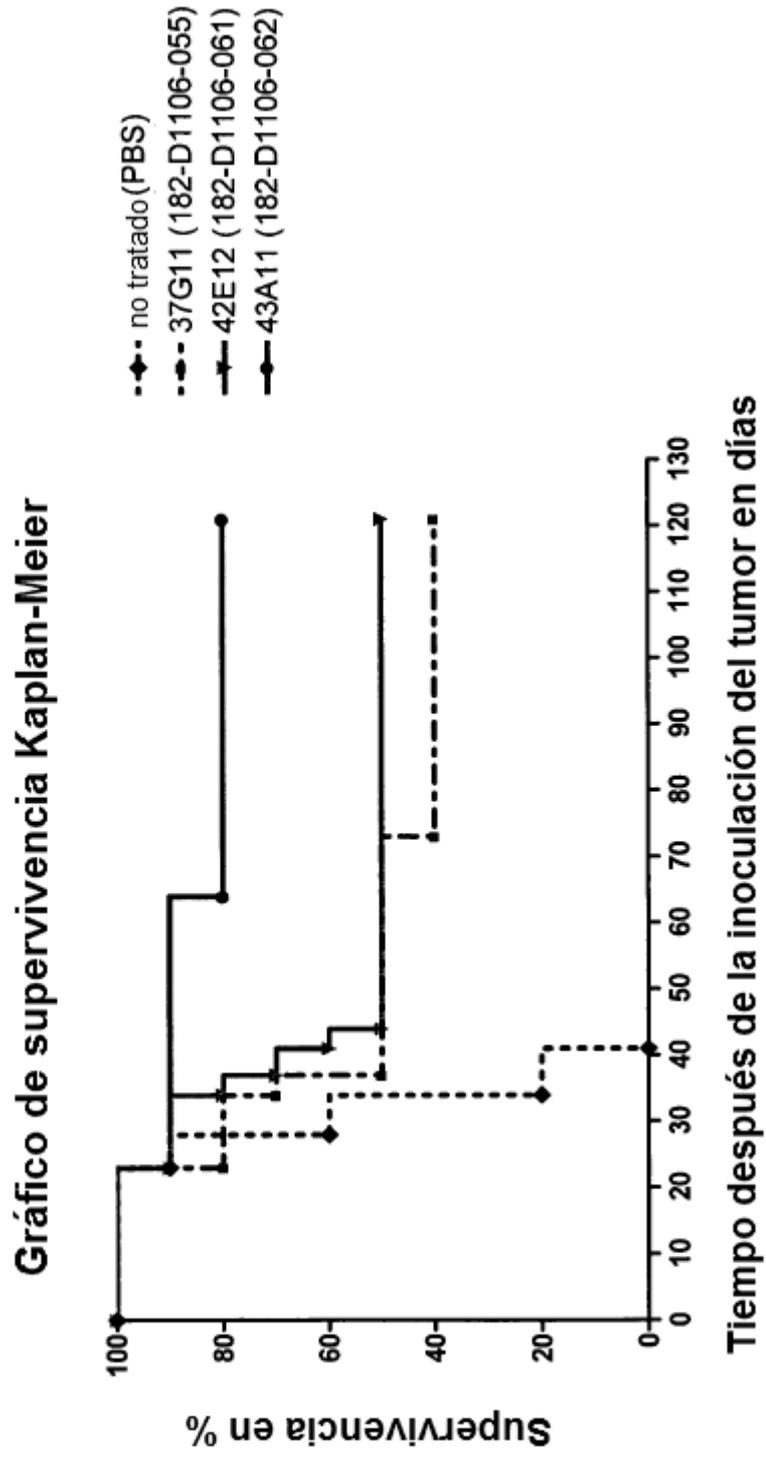


Fig. 25B

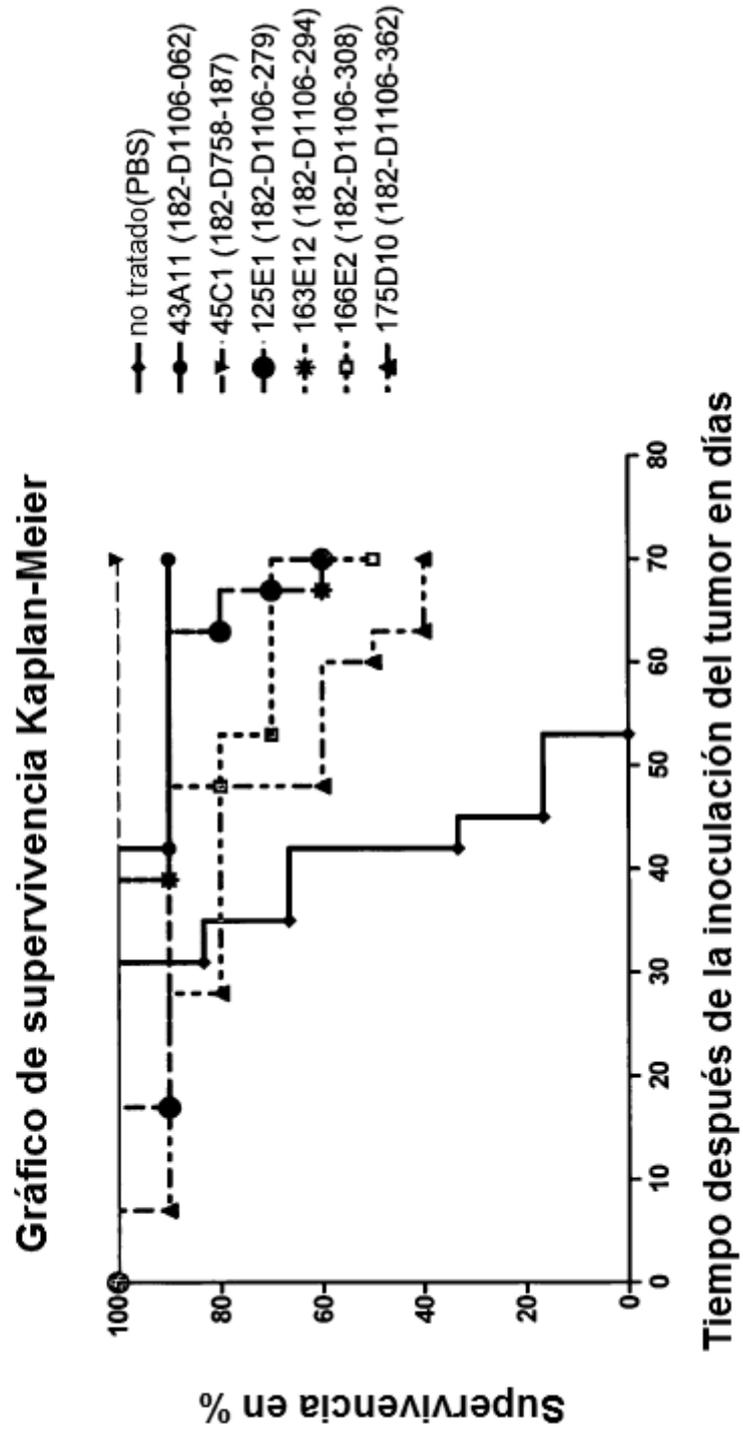


Fig. 26

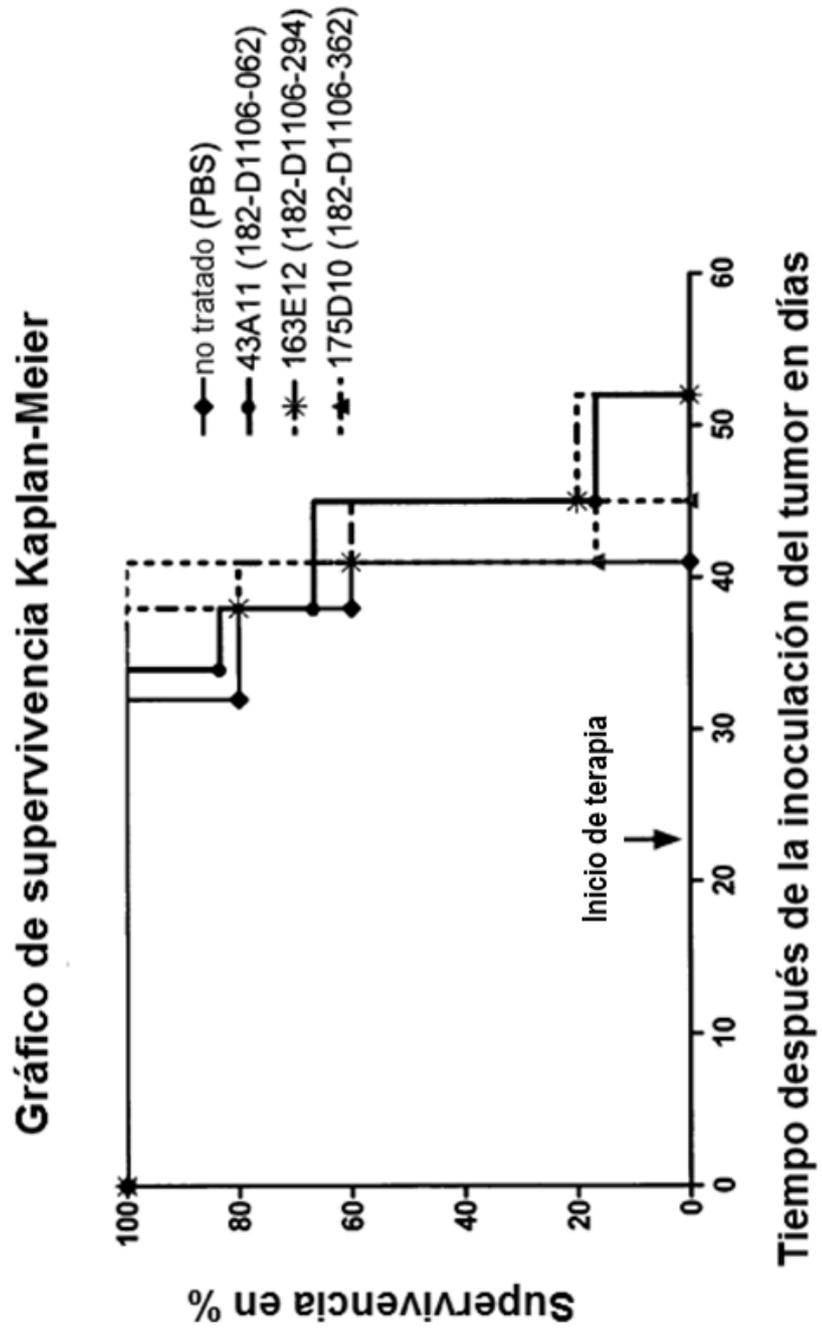


Fig. 27A

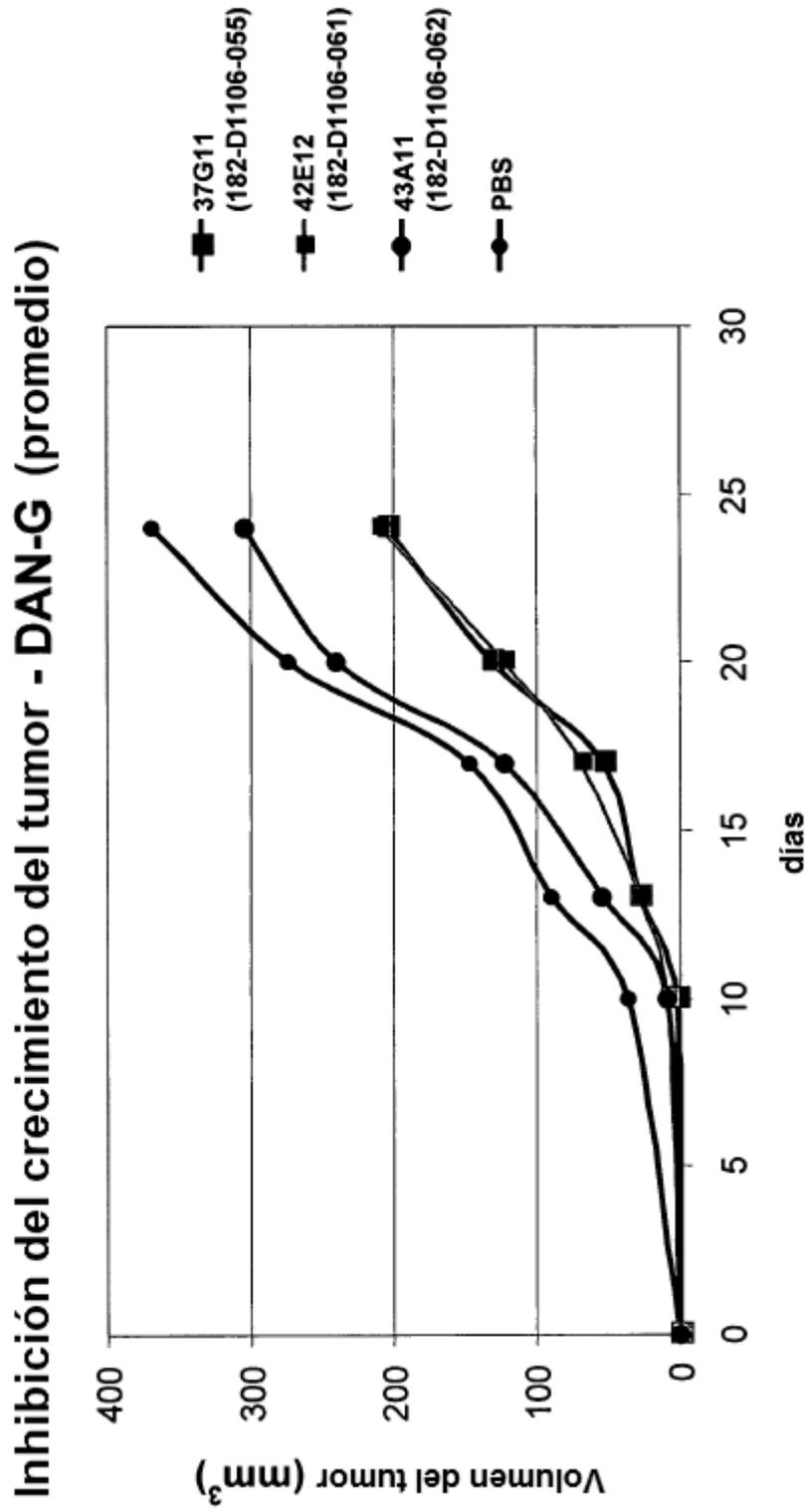


Fig. 27B

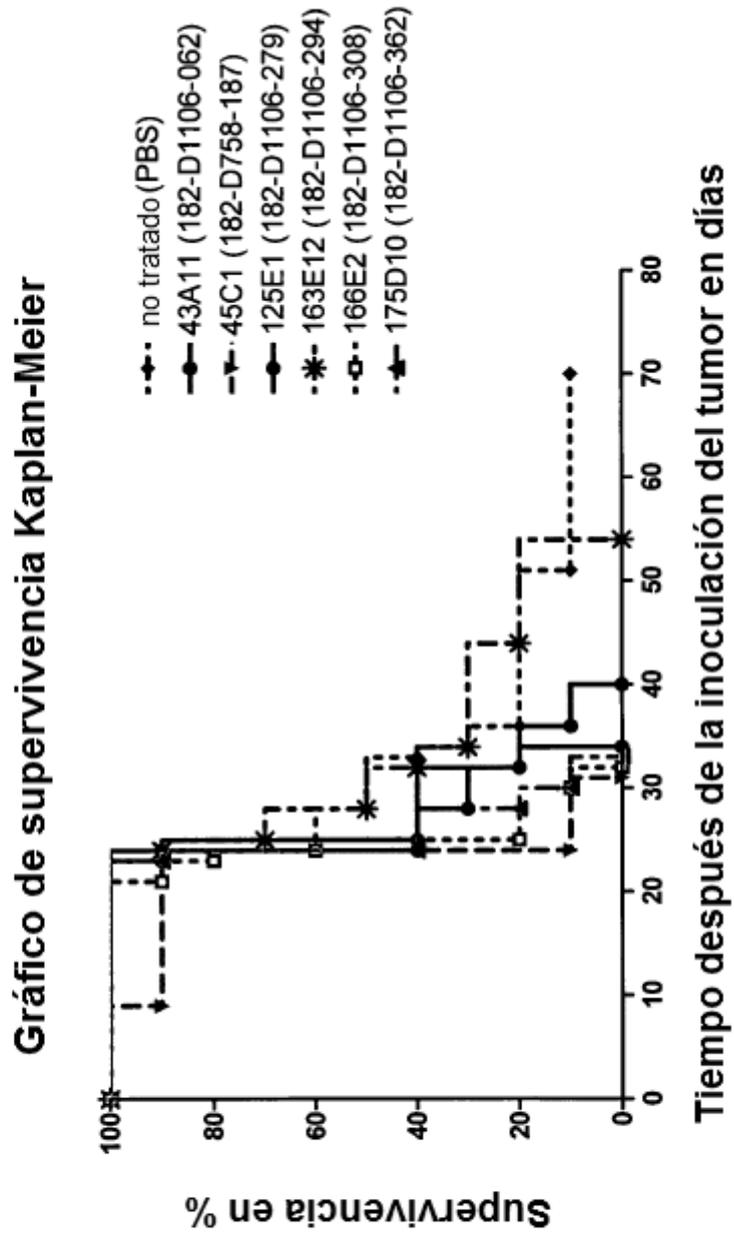
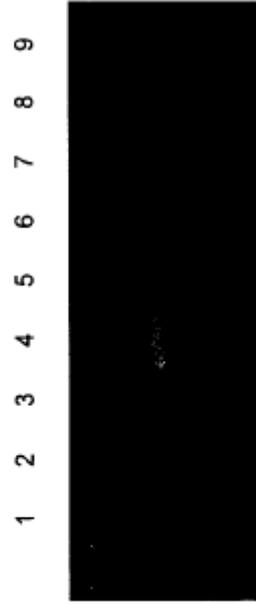


Fig. 28



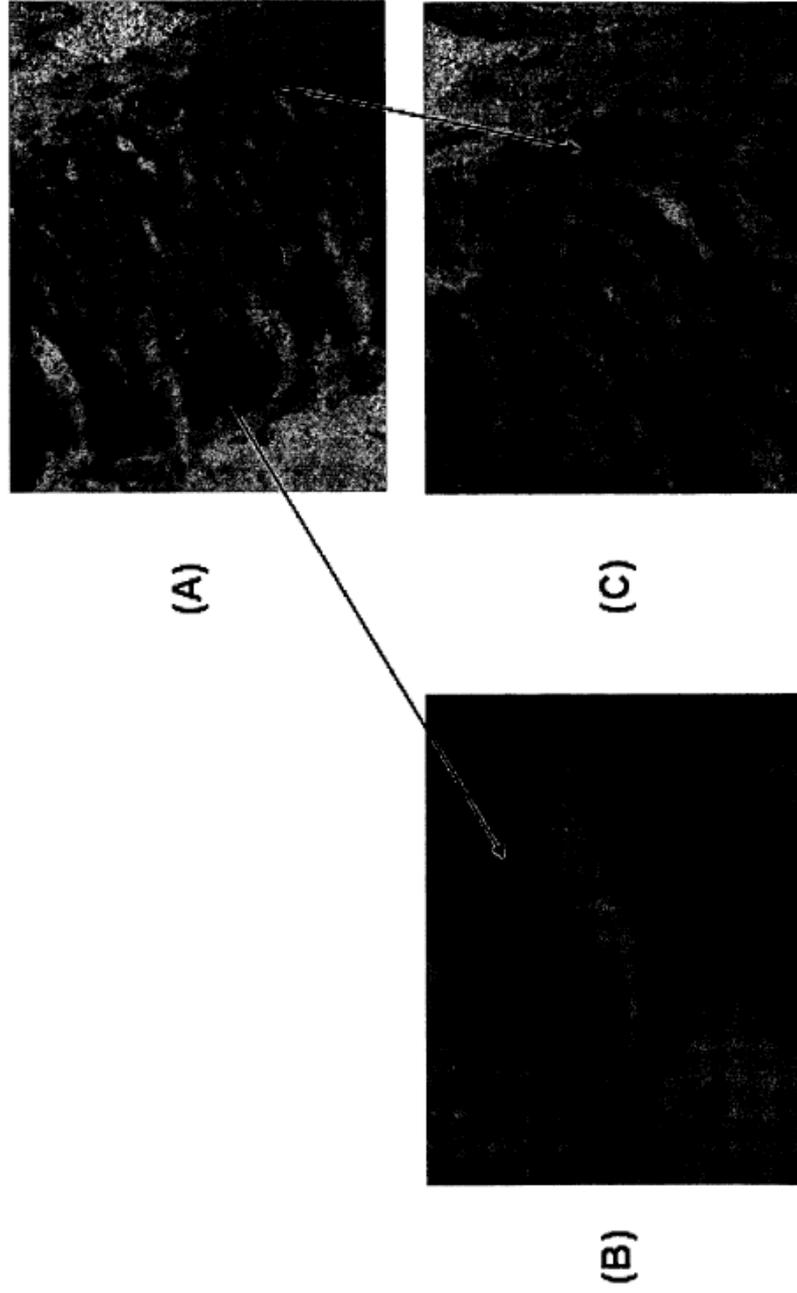


Fig. 29

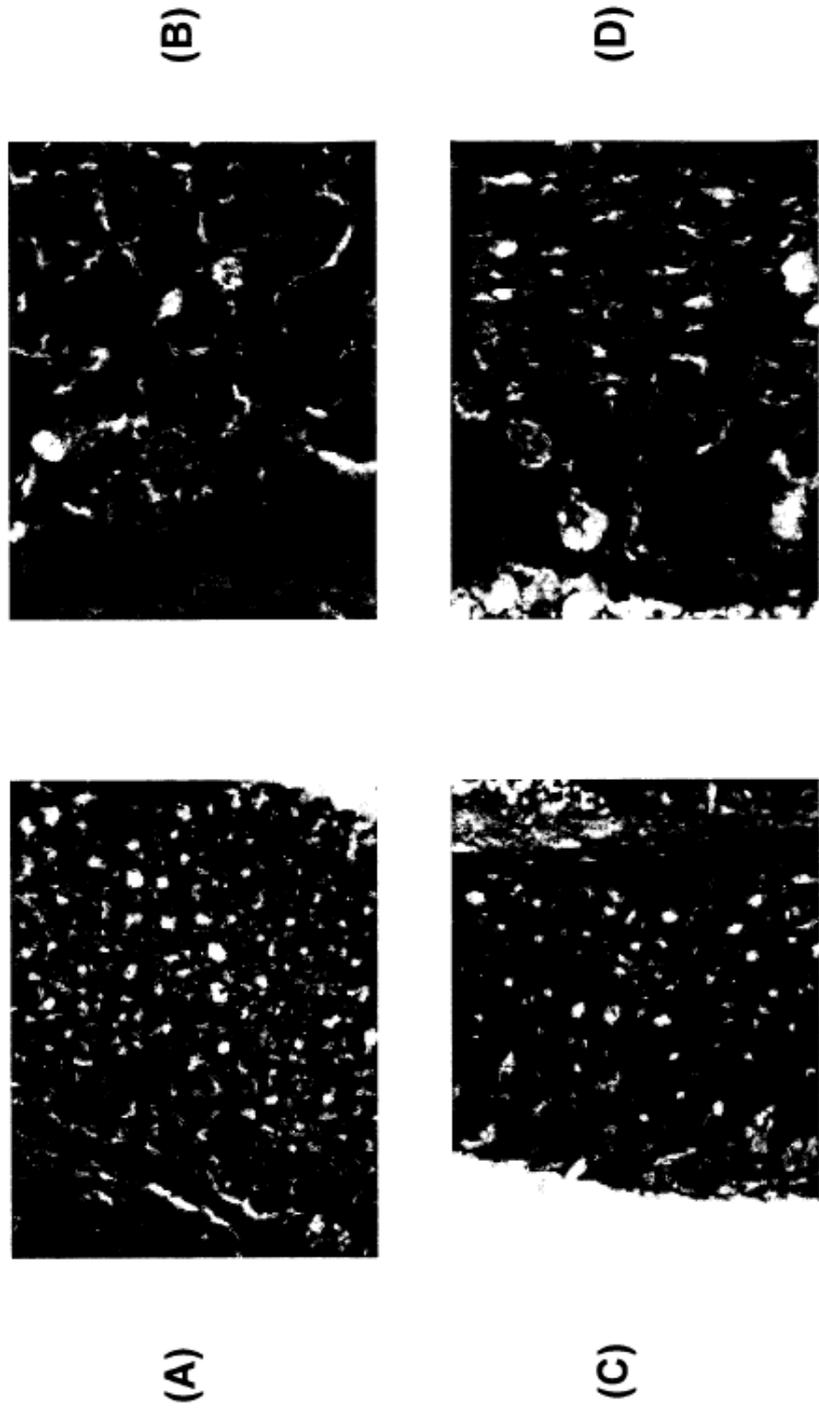


Fig. 30

Fig. 31A

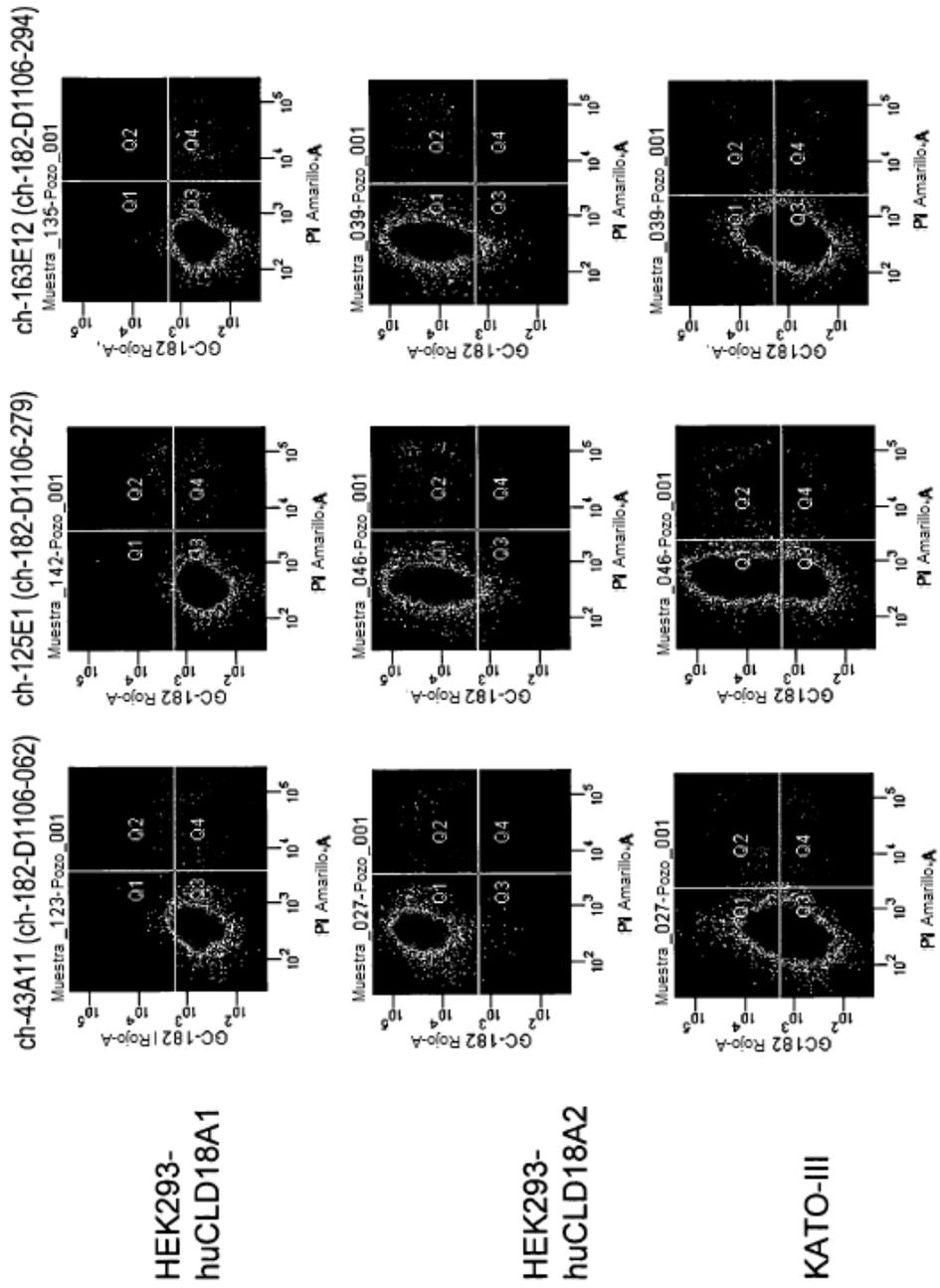


Fig. 31B

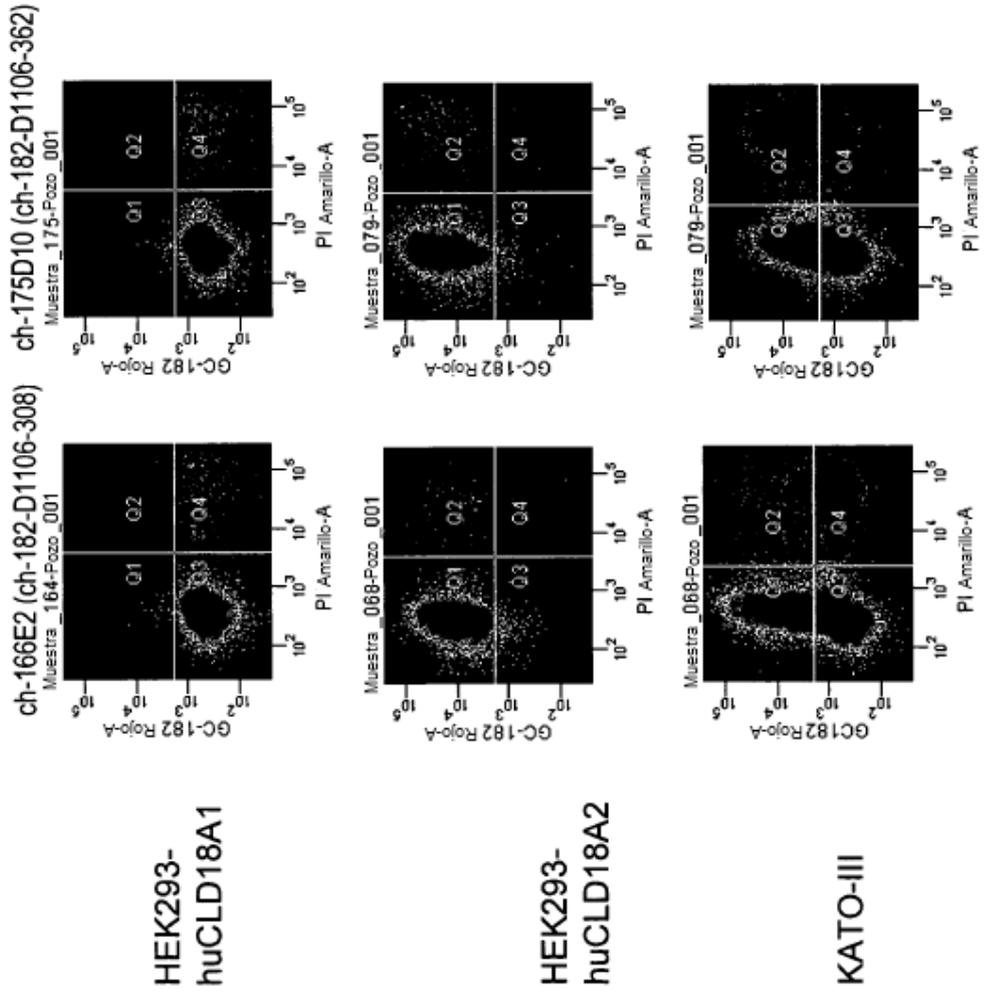


Fig. 32

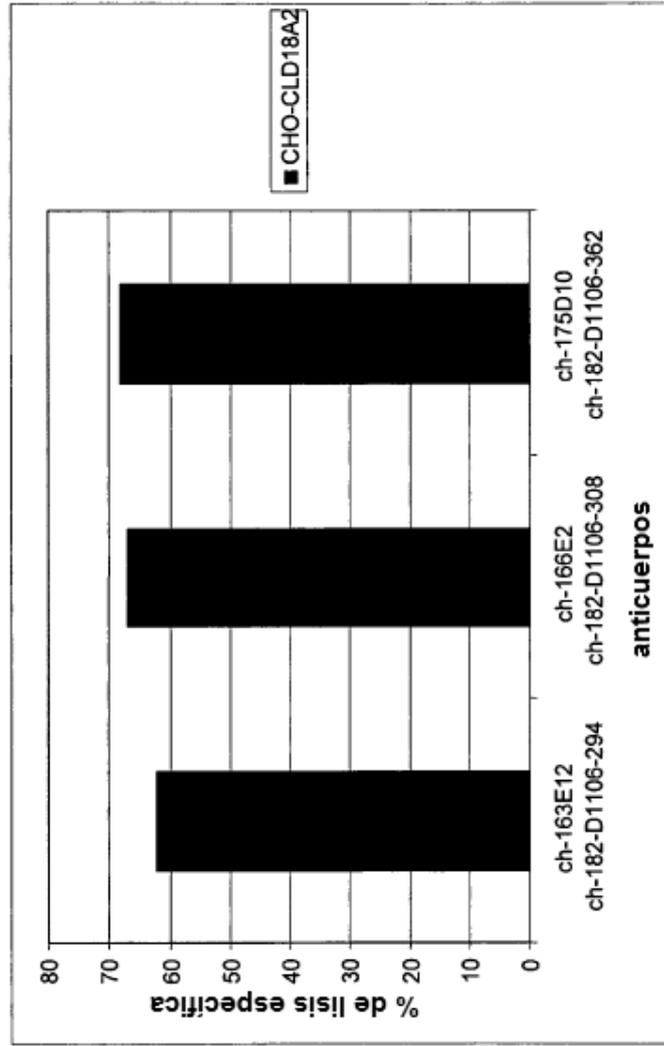


Fig. 33

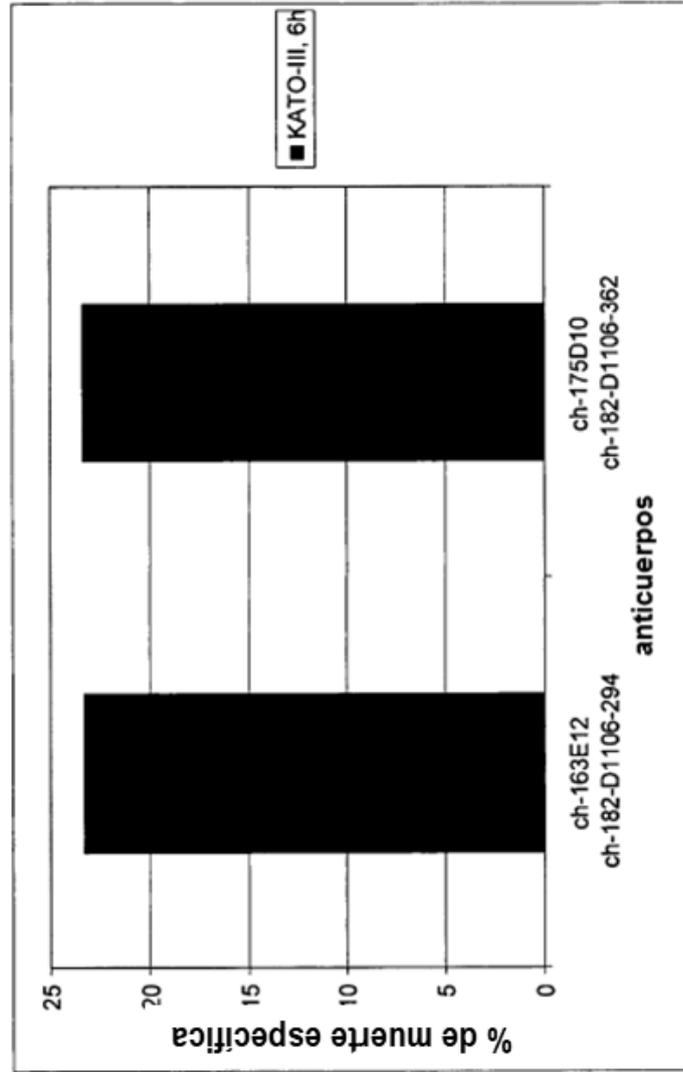


Fig. 34

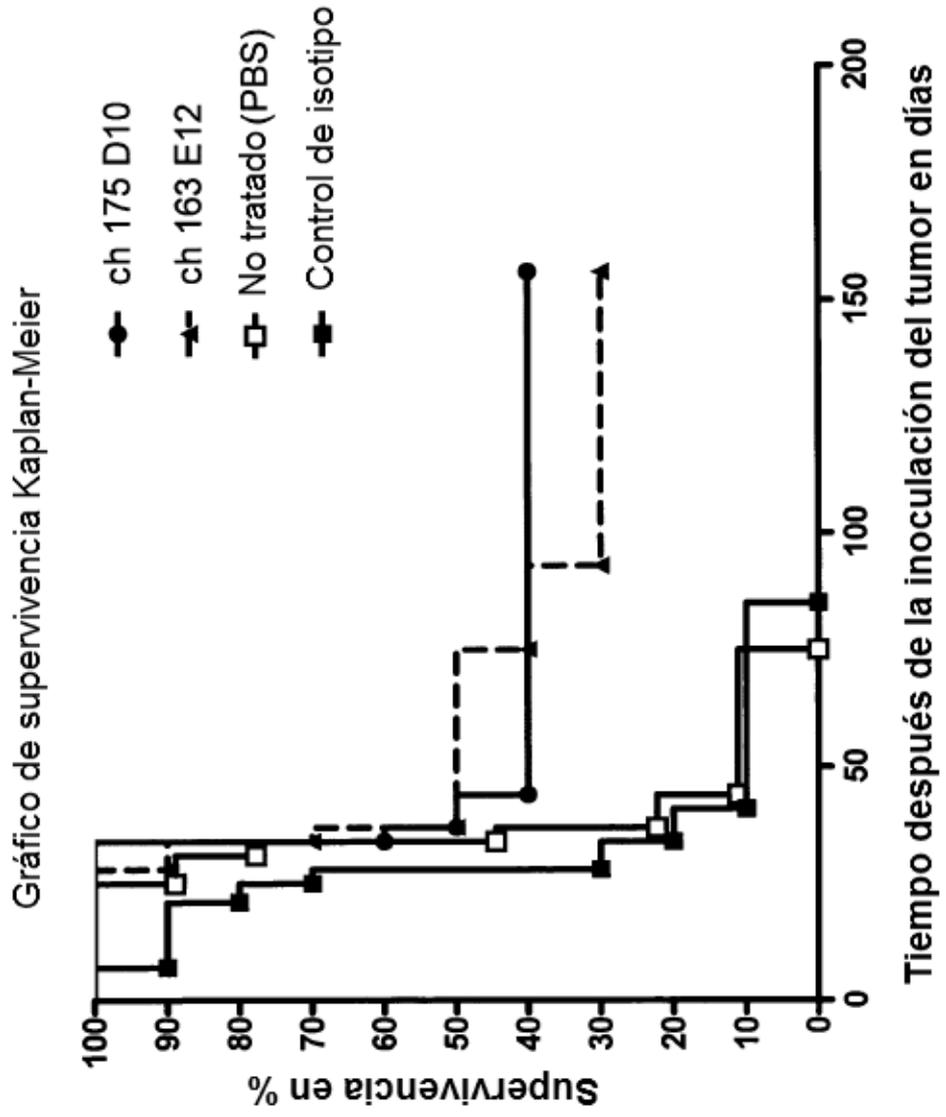


Fig. 35

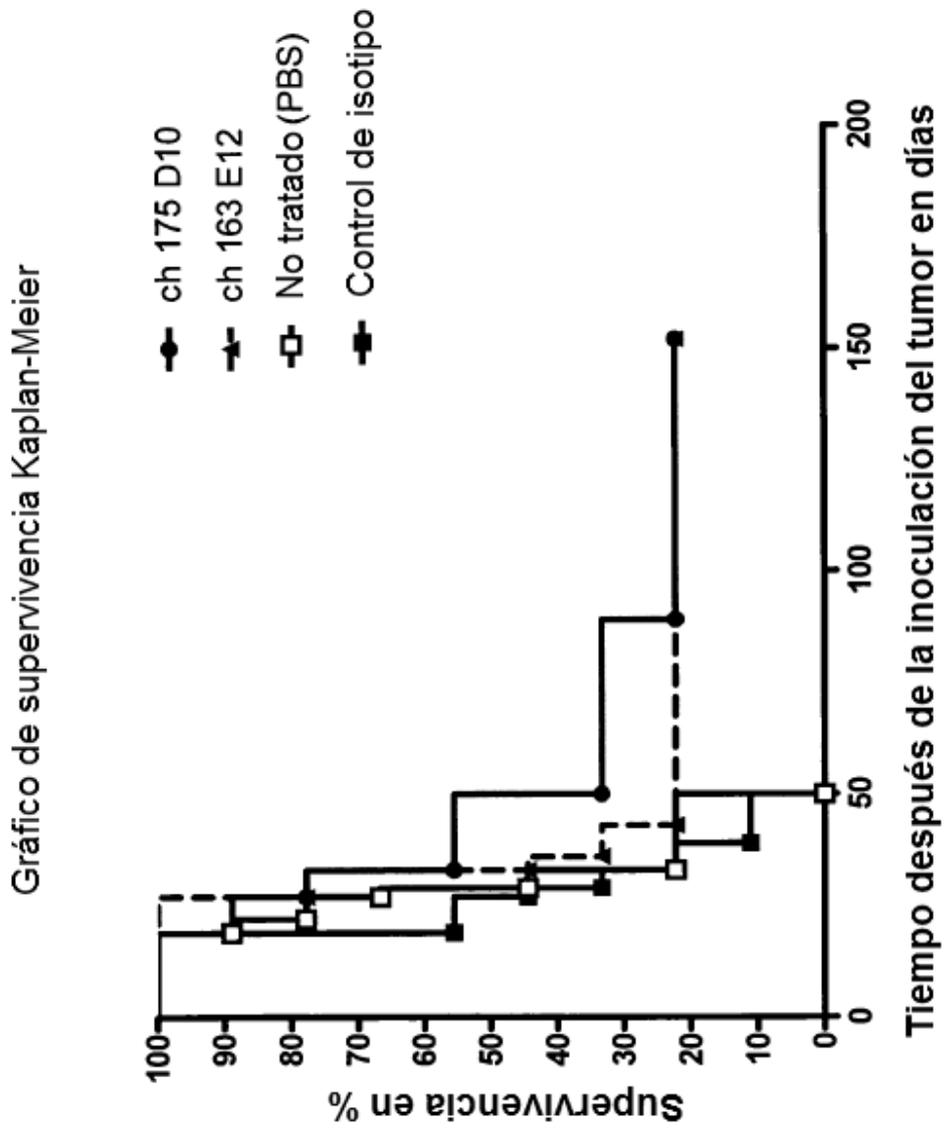


Fig. 36

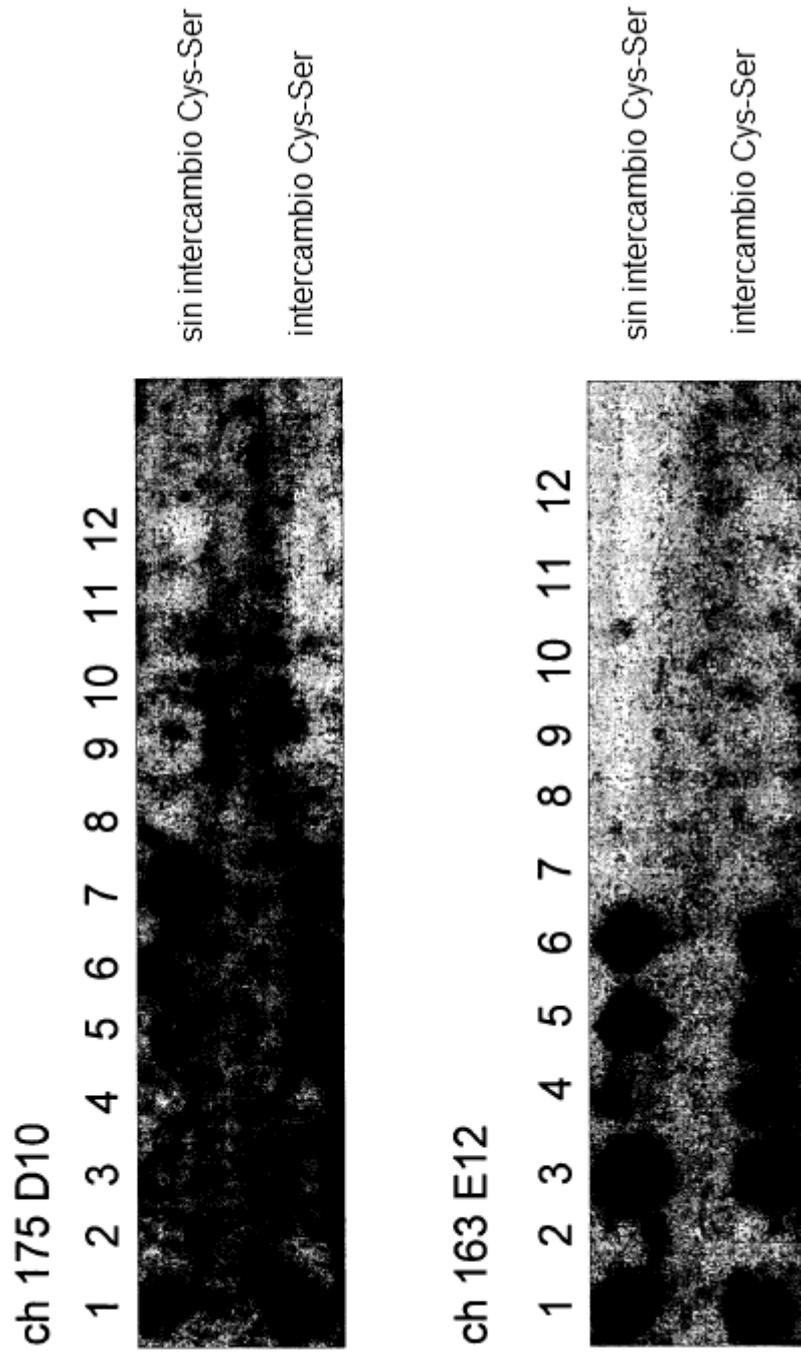


Fig. 37

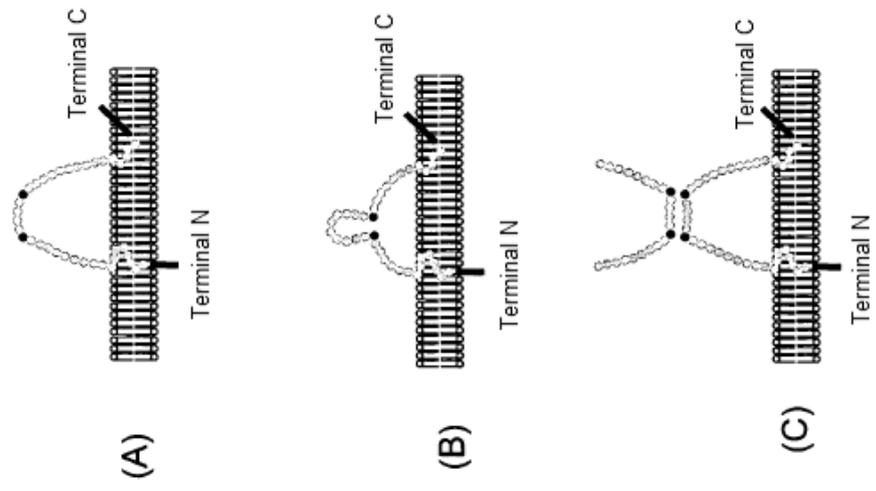


Fig. 38A: ch-175D10

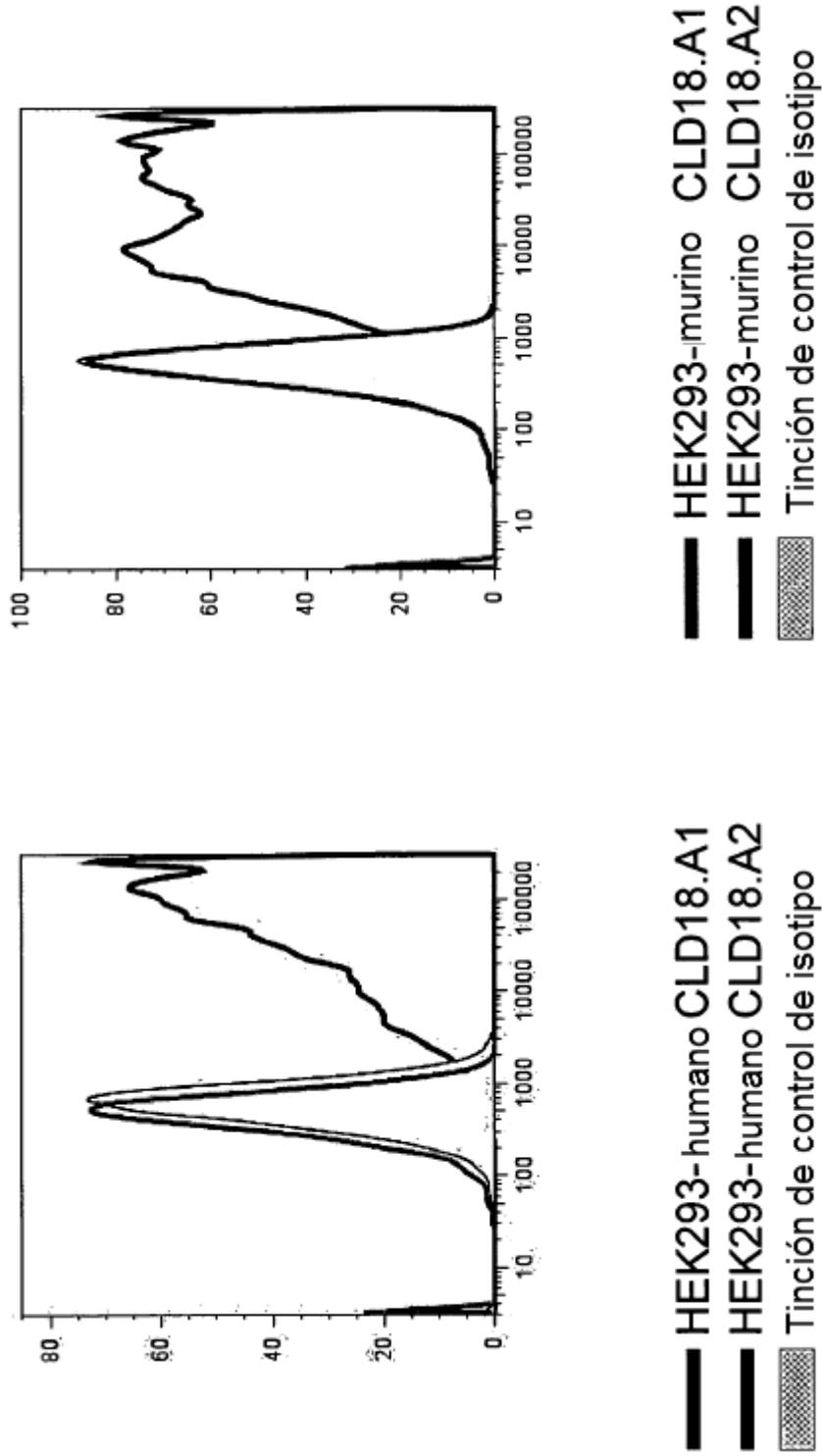
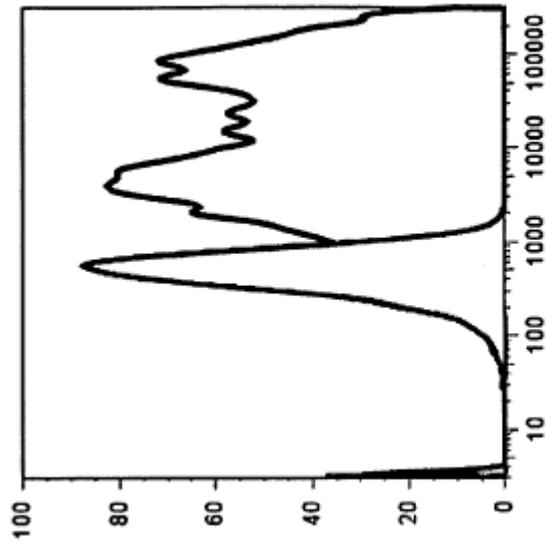
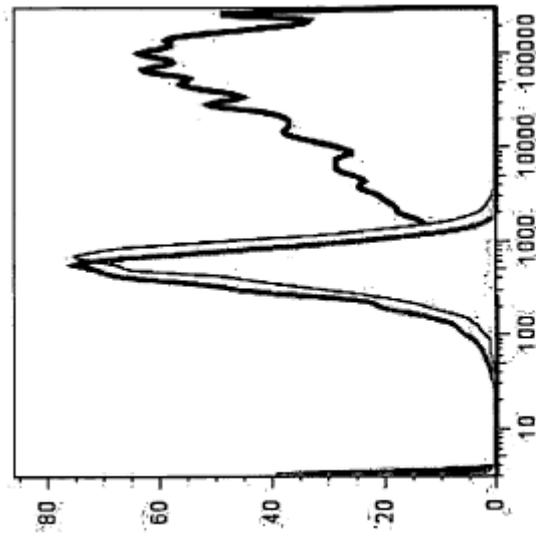


Fig. 38B: ch-163E12



— HEK293- murino CLD18.A1
- - HEK293- murino CLD18.A2
▨ Tinción de control de isotipo



— HEK293- humano CLD18.A1
- - HEK293- humano CLD18.A2
▨ Tinción de control de isotipo

T

Fig. 38C: ch-125E1

