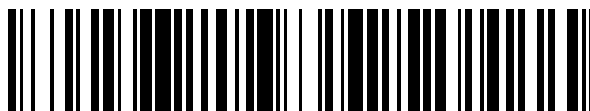


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 674**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.10.2012 PCT/US2012/062862**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13067055**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2012 E 12784848 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.08.2018 EP 2773373**

54 Título: **Procedimientos para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas**

30 Prioridad:

**01.11.2011 US 201161554426 P**

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

**25.01.2019**

73 Titular/es:

**BIONOMICS, INC. (100.0%)  
11575 Sorrento Valley Road 203  
San Diego, CA 92121, US**

72 Inventor/es:

**REYES, CHRISTOPHER, L.;  
CHU, PETER;  
TAN, XIANGYANG;  
YANG, WEIXING y  
GRAFF, CHRISTILYN**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 697 674 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

Procedimientos para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas

**Referencia al listado de secuencias**

5 La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en formato electrónico. El listado de secuencias se proporciona como un archivo titulado BIONO.001WO\_Sequence.txt, creado el 25 de octubre de 2012, que tiene un tamaño aproximado de 31 kb.

**Referencia a solicitudes relacionadas**

10 La presente solicitud reivindica la prioridad de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos 61/554426, presentada el 1 de noviembre de 2011 y titulada PROCEDIMIENTOS PARA BLOQUEAR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS

**Campo**

15 Esta aplicación se refiere en general al campo de la biología del cáncer. Más particularmente, las realizaciones se dirigen a anticuerpos contra GPR49 y usos de dichos anticuerpos. Varios aspectos se refieren a anticuerpos monoclonales, humanizados o completamente humanos contra GPR49, hibridomas u otras líneas celulares que expresan dichos anticuerpos, ácidos nucleicos y vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, y procedimientos para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas con dichos anticuerpos.

**Antecedentes**

20 El receptor 49 acoplado a proteínas G (GPR49, de sus siglas en inglés), también conocido como LGR5/HG38/FEX, pertenece a los receptores acoplados a proteínas G que contienen repeticiones ricas en leucina (LGR, de sus siglas en inglés) que son estructuralmente similares a los receptores de la hormona glucoproteica. Los LGR se dividen en tres subgrupos: (1) los receptores de la hormona glucoproteica que incluyen el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH, de sus siglas en inglés), el receptor de la hormona estimulante del foliculo (FSH, de sus siglas en inglés) y el receptor de la hormona luteinizante (LH, de sus siglas en inglés); (2) receptores de relaxina LGR7 y LGR8; y (3) GPR48, GPR49 y LGR6. El GPR49 se expresa en varios tejidos que incluyen el intestino, el músculo esquelético, la placenta, el cerebro y la médula espinal. Sin embargo, poco se sabe sobre la función del GPR49.

25 Sasaki Y. y col., Biochemical and Biophysical Research Communications Academic Press inc. Orlando, FL, US- Vol. 394, NO.3, 9 de abril de 2010, páginas 498-502 desvela un anticuerpo monoclonal, KM4056, que reconoce específicamente el LGR5 humano, y tiene actividad citotóxica *in vitro* e *in vivo* contra células de ovario de hámster chino modificadas genéticamente que expresan una proteína de fusión exógena del LGR5-myc/His.

**Sumario**

30 La invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido del receptor 49 acoplado a proteínas G (GPR49) con una  $K_d$  de menos de  $10 \times 10^{-9}$  M para una célula madre cancerosa, en el que el polipéptido del GPR49 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la cantidad eficaz es suficiente para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, en el que el crecimiento de células madre cancerosas se mide en un ensayo de esferas tumorales como un crecimiento de una célula madre de cáncer de colon primario en condiciones *in vitro* libres de suero y de bajo anclaje, comprendiendo el ensayo de esferas tumorales las fases de células tumorales de colon único vivo procedentes de xenoinjertos de tumor de colon primario o de biopsias de pacientes recientes que se clasifican y se colocan en placas entre 1-1000 células por pocillo en placas de fijación ultra bajas de 96 pocillos, manteniéndose las células en medio de células madre cancerosas durante 3 semanas, y realizándose intercambio de medio nuevo cada 3-4 días. En un aspecto, la cantidad eficaz del anticuerpo es suficiente para reducir el crecimiento de células madre cancerosas en aproximadamente un 50 %, aproximadamente un 40 %, aproximadamente un 30 %, o aproximadamente un 20 % en comparación con las células madre cancerosas que no han sido tratadas por el anticuerpo.

45 En otros aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG, un anticuerpo de clase IgG1, un anticuerpo humano o un anticuerpo de ratón. En aspectos adicionales, el polipéptido del GPR49 consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

En aspectos adicionales, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal 14F7.1, 5F2.5, 8E9.1, 76C12, 18G7.1, 78F05, 5D6.3, 1B3.5, 14A8.1, 5B10.1 o 7C3.4.

50 En diversos aspectos, el anticuerpo inhibe competitivamente un anticuerpo monoclonal seleccionado del grupo que consiste en 71C10, 86C11, 66D05, 76C12, 78F05 y 76B04, o un anticuerpo monoclonal producido por una célula de hibridoma seleccionada del grupo que consiste en el anticuerpo monoclonal 2B5.5, 7F8.2 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1,

9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2.

Se describe adicionalmente un procedimiento para producir un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente al GPR49, que comprende cultivar una célula hospedadora que comprende un vector que comprende una secuencia de polinucleótido que codifica el anticuerpo anterior; y que recupera dicho anticuerpo, o fragmento del mismo.

Además, se describe un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido del receptor 49 acoplado a proteínas G (GPR49) con una  $K_d$  de menos de  $10 \times 10^{-9}$  M, para reducir la abundancia de células madre cancerosas competentes para el crecimiento en una población celular en un paciente, en el que el polipéptido del GPR49 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Además, se describe un anticuerpo monoclonal que se une al polipéptido del receptor 49 acoplado a proteínas G (GPR49) con una  $K_d$  de menos de  $10 \times 10^{-9}$  M, para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas en un paciente, en el que el polipéptido del GPR49 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

### **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab anti-GPR49 a GPR49-Fc humanos mediante ELISA.

La Figura 2 es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab anti-GPR49 a células HEK293E transfectadas con GPR49-HA humanos mediante FACS.

La Figura 3 es un conjunto de gráficos de líneas que muestran los valores de EC50 de 3 candidatos Dyax Fab en células CHO-GPR49 (Fig. 3A) o células CHO parentales (Fig. 3B) mediante la unión de FACS.

La Figura 4 es un conjunto de gráficos de barras que muestran la unión de las Fab GPR49 a células SW620 de tumor de colon según se mide mediante media geométrica (Fig. 4A) o porcentaje de células positivas (Fig. 4B).

La Figura 5A es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab GPR49 a células SW480 de tumor de colon según se mide mediante la media geométrica de FACS.

La Figura 5B es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab GPR49 a células SW480 de tumor de colon según se mide por el porcentaje de células positivas de FACS.

La Figura 5C es un panel de histogramas FACS de diversas concentraciones de la Fab 76C12 utilizada para unir células SW480 de tumor de colon.

La Figura 6A es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab GPR49 a células HCT116 de tumor de colon según se mide mediante la media geométrica de FACS.

La Figura 6B es un gráfico de barras que muestra la unión de las Fab GPR49 a células HCT116 de tumor de colon según se mide por el porcentaje de células positivas de FACS.

La Figura 6C es un panel de histogramas FACS de diversas concentraciones de la Fab 76C12 utilizada para unir células HCT116 de tumor de colon.

Las Figuras 7A-C son gráficos que muestran la unión de anticuerpos GPR49 murinos a células CHO que expresan GPR49-Flag-His mediante FAC.

Las Figuras 8A y 8C son gráficos que muestran la unión de anticuerpos GPR49 murinos CHO a células que expresan GPR49-Flag-His mediante FAC.

Las Figuras 8B y 8D son tablas que indican la EC50 de los anticuerpos de las Figuras 8A y 8C, respectivamente.

La Figura 9A, 9C, 9E y 9G son gráficos que muestran la unión de anticuerpos de ratón de segunda generación a GPR49 mediante ELISA directo.

Las Figuras 9B, 9D, 9F, y 9H son tablas que indican la EC50 de los anticuerpos de las Figuras 9A, 9C, 9E y 9G, respectivamente.

La Figura 10A es un gráfico de barras que muestra el número promedio de esferas tumorales de células tumorales de colon clasificadas GPR49+, clasificadas GPR49- o no clasificadas.

La Figura 10B es una imagen microscópica de células GPR49+ y GPR49- en el ensayo de esferas tumorales.

La Figura 11 es un conjunto de gráficos que muestran el volumen tumoral (Fig. 11A) y el peso corporal (Fig. 11B) a lo largo del tiempo de células tumorales de colon clasificadas GPR49+ MoFlo inoculadas en ratones.

La Figura 12A es una imagen de colonias formadas por células tratadas con el anticuerpo 76C12 (panel superior) o el tratamiento de control IDEC152 (panel inferior) en el ensayo de esferas tumorales.

La Figura 12B es un gráfico que muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de esferas tumorales de células madre cancerosas en células tratadas con los anticuerpos 78F05 o 76C12.

La Figura 13 es un gráfico que muestra la inhibición de la formación de esferas de células madre del cáncer de colon mediante el tratamiento de células sin anticuerpo, el isotipo del anticuerpo monoclonal o el anticuerpo 76C12.

La Figura 14 es un conjunto de gráficos que muestran la inhibición del crecimiento tumoral para diferentes anticuerpos en un modelo de cáncer de colon primario con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53.

La Figura 15 es un cuadro que muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento tumoral.

La Figura 16 es un cuadro que muestra el porcentaje de inhibición tumoral de tumores de CCR tratados mediante la combinación del Abm GPR49 + Irinotecan con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53.

La Figura 17 es un gráfico de líneas que muestra la inhibición del crecimiento tumoral en un modelo de cáncer de colon primario con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN, H-Ras, APC, TP53, FGFR2, VANGL2, STK11, JAK2 y RB1.

La Figura 18A es un gráfico que muestra que los anticuerpos anti-GPR49 reducen la frecuencia de las células

madre cancerosas en tumores de cáncer de colon con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53.

La Figura 18B es un gráfico que muestra que el tratamiento con anticuerpos anti-GPR49 inhibe la capacidad de los anticuerpos contra tumores CCR con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53 a partir de la formación de nuevos tumores cuando se trasplantan a ratones receptores secundarios.

La Figura 19 es un gráfico que muestra que el tratamiento con el Abm GPR49 18G.7.1 reduce la frecuencia de las células madre cancerosas de los tumores CCR con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN, H-Ras, APC, TP53, FGFR2, VANGL2, STK11, JAK2 y RB1. La frecuencia de CMC se midió en un reimplante en serie, un ensayo de dilución limitante con células tumorales de CCR primarias tratadas previamente como se indica.

La Figura 20 es un gráfico que muestra que el tratamiento con anticuerpos anti-GPR49 + Irinotecan inhibe la capacidad de los tumores CCR que tienen mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN, H-Ras, APC, TP53, FGFR2, VANGL2, STK11, JAK2 y RB1 para crecer tras la reimplantación en ratones receptores secundarios.

### **Descripción detallada**

La invención se refiere a un procedimiento *in vitro* para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido del receptor 49 acoplado a proteínas G (GPR49) con una  $K_d$  de menos de  $10 \times 10^{-9}$  M para una célula madre cancerosa, en el que el polipéptido del GPR49 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la cantidad eficaz es suficiente para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, en el que el crecimiento de células madre cancerosas se mide en un ensayo de esferas tumorales como un crecimiento de una célula madre de cáncer de colon primario en condiciones *in vitro* libres de suero y de bajo anclaje, comprendiendo el ensayo de esferas tumorales las fases de células tumorales de colon único vivo procedentes de xenoinjertos de tumor de colon primario o de biopsias de pacientes recientes que se clasifican y se colocan en placas entre 1-1000 células por pocillo en placas de fijación ultra bajas de 96 pocillos, manteniéndose las células en medio de células madre cancerosas durante 3 semanas, y realizándose intercambio de medio nuevo cada 3-4 días.

Se describen los anticuerpos contra GPR49 y la inhibición del crecimiento de células madre cancerosas con dichos anticuerpos. Varios aspectos se refieren a anticuerpos humanizados o completamente humanos contra GPR49, hibridomas u otras líneas celulares que expresan dichos anticuerpos, ácidos nucleicos y vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, y procedimientos para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas con dichos anticuerpos.

### **Anticuerpos anti-GPR49**

Se describen los anticuerpos anti-GPR49. Como se utiliza en el presente documento, el GPR49 incluye, pero no se limita a, el GPR49 humano que incluye el polipéptido del N° de accesoión NCBI NP\_003658.1 (SEQ ID NO: 1), que está codificado por la secuencia de nucleótidos codificante dentro de NM\_003667.2 (SEQ ID NO: 2), o fragmentos de los mismos. Los ejemplos de fragmentos del GPR49 contemplados en el presente documento incluyen el ectodominio, el dominio transmembrana o el dominio intracelular del GPR49 y porciones del mismo.

Como se utiliza en el presente documento, el término "anticuerpo" incluye, pero no se limita a, anticuerpos sintéticos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos producidos de forma recombinante, intracuerpos, anticuerpos multiespecíficos (que incluyen anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos sintéticos, Fvs monocatenarios (scFv), fragmentos Fab, fragmentos F(ab'), Fv con enlaces disulfuro (sdFv) (incluidos sdFv biespecíficos), y anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores. Los anticuerpos de varias realizaciones proporcionadas en el presente documento pueden ser mono-específicos, biespecíficos, trispecíficos o de mayor multiespecificidad. Los anticuerpos multiespecíficos pueden ser específicos para diferentes epítopos de un polipéptido o pueden ser específicos tanto para un polipéptido como para un epítipo heterólogo, tal como un polipéptido heterólogo o material de soporte sólido. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO91/00360; WO 92/05793; Tutt, y col., J. Immunol. 147:60-69 (1991); las patentes de los EE.UU. n.º 4.474.893; 4.714.681; 4.925.648; 5.573.920; 5.601.819; Kostelny y col., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992);

Otros anticuerpos anti-GPR49 contemplados incluyen anticuerpos "oligoclonales". Como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpos oligoclonales" se refiere a una mezcla predeterminada de distintos anticuerpos monoclonales. Los procedimientos para generar anticuerpos oligoclonales son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, "Sección de ejemplos", ejemplo 1, publicación PCT WO 95/20401; las patentes de Estados Unidos n.º 5.789.208 y 6.335.163;. En determinadas realizaciones, los anticuerpos oligoclonales consisten en una mezcla predeterminada de anticuerpos contra uno o más epítopos generados en una sola célula. En lo que respecta, los anticuerpos oligoclonales comprenden una pluralidad de cadenas pesadas capaces de emparejarse con una cadena ligera común para generar anticuerpos con múltiples especificidades (por ejemplo, la publicación PCT WO 04/009618, los anticuerpos oligoclonales son particularmente útiles cuando se desea dirigirse a múltiples epítopos en una sola molécula diana (por ejemplo, GPR49). Los expertos en la materia sabrán o pueden determinar qué tipo de anticuerpo o mezcla de anticuerpos es aplicable para un fin previsto y una necesidad deseada. En particular, los anticuerpos de varios aspectos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno GPR49 (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad

- (CDR, de sus siglas en inglés) de un anticuerpo anti-GPR49). También se contempla específicamente que los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno GPR49 (por ejemplo, una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés) de un anticuerpo anti-GPR49).
- 5 Varias realizaciones del procedimiento anterior se dirigen a las Fab humanas anti-GPR49 producidas como se describe en los siguientes ejemplos, que incluyen los anticuerpos 71C10, 86C11, 66D05, 76C12, 78F05 y 76B04, que se unen a un ectodominio humano GPR49-Fc (GPR49-RFc) (SEQ ID NO: 3). Varias realizaciones se dirigen a las IgG humanas de longitud completa de estas Fab como se describe en los ejemplos.
- 10 Varias realizaciones del procedimiento anterior se refieren a los anticuerpos monoclonales de ratón generados contra el ectodominio GPR49 humano (GPR49-His) (SEQ ID NO: 4) como se describe en los siguientes ejemplos, que incluyen los anticuerpos 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5 y 6G10.1.
- 15 Varias realizaciones del procedimiento anterior se dirigen a los anticuerpos monoclonales de ratón generados contra el GPR49 humano de longitud completa como se describe en los ejemplos a continuación, que incluyen los anticuerpos 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2.
- 20 Los anticuerpos anti-GPR49 de varias realizaciones pueden ser de cualquier tipo (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY), clase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) o subclase de molécula de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden tener una cadena pesada y ligera. Una serie de cadenas pesadas de IgG, IgE, IgM, IgD, IgA e IgY se pueden emparejar con una cadena ligera de las formas kappa o lambda.
- 25 Varios aspectos se refieren a un hibridoma que produce la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo anti-GPR49, que incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación. En un aspecto, el hibridoma produce la cadena ligera y/o la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.
- 30 Algunos aspectos se dirigen a una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo anti-GPR49, que incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación. En un aspecto, una molécula de ácido nucleico codifica la cadena ligera o la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal humanizado o completamente humano.
- 35 Varios aspectos se dirigen a un vector que comprende una molécula o moléculas de ácido nucleico que codifican una cadena ligera y/o una cadena pesada de un anticuerpo anti-GPR49, que incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.
- 40 Otros aspectos se refieren a un procedimiento para producir un anticuerpo anti-GPR49 que comprende transfectar al menos una célula hospedadora con al menos una molécula de ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-GPR49, que expresa la molécula de ácido nucleico en dicha célula hospedadora y que aísla dicho anticuerpo. En varios aspectos, dicho anticuerpo anti-GPR49 incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.
- 45 En varias realizaciones, los anticuerpos pueden unirse específicamente a GPR49 y fragmentos antigénicos del mismo con una constante de disociación o  $K_d$  ( $k_{off}/k_{on}$ ) de menos de  $10^{-5}$  M, o de menos de  $10^{-6}$  M, o de menos de  $10^{-7}$  M, o de menos de  $10^{-8}$  M, o de menos de  $10^{-9}$  M, o de menos de  $10^{-10}$  M, o de menos de  $10^{-11}$  M, o de menos de  $10^{-12}$  M, o de menos de  $10^{-13}$  M.
- 50 En otra realización, el anticuerpo puede unirse a GPR49 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una  $K_{off}$  de menos de  $1 \times 10^{-3} s^{-1}$ . En otras realizaciones, el anticuerpo se une a GPR49 y fragmentos antigénicos del mismo con una  $K_{off}$  de menos de  $10^{-3} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-3} s^{-1}$ , menos de  $10^{-4} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-4} s^{-1}$ , menos de  $10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-5} s^{-1}$ , menos de  $10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-6} s^{-1}$ , menos de  $10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-7} s^{-1}$ , menos de  $10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-8} s^{-1}$ , menos de  $10^{-9} s^{-1}$ , menos de  $5 \times 10^{-9} s^{-1}$ , o de menos de  $10^{-10} s^{-1}$ .
- 55

En otra realización, el anticuerpo se une a GPR49 y/o fragmentos antigénicos del mismo con una constante de tasa de asociación o tasa  $k_{on}$  de al menos  $10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{-5} M^{-1}s^{-1}$ , al menos  $10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{-6} M^{-1}s^{-1}$ , al menos  $10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{-7} M^{-1}s^{-1}$ , o al menos  $10^{-8} M^{-1}s^{-1}$ , o al menos  $10^{-9} M^{-1}s^{-1}$ .

5 Una realización adicional del procedimiento anterior incluye anticuerpos que tienen ciertas características bioquímicas preferidas, tales como un punto isoeléctrico (pI) o temperatura de fusión ( $T_m$ , de sus siglas en inglés) particular.

En una realización del procedimiento anterior, los anticuerpos de alta afinidad tienen un pI que varía de 5,5 a 9,5. En una realización, los anticuerpos de alta afinidad de varias realizaciones tienen una  $T_m$  que varía de aproximadamente 65 °C a aproximadamente 120 °C.

10 Los anticuerpos de varias realizaciones también abarcan aquellos que tienen semividas (por ejemplo, semividas de suero) en un mamífero, (por ejemplo, un ser humano), de más de 1 día, más de 2 días, más de 3 días, más de 4 días, más de 5 días, más de 6 días, más de 7 días, más de 8 días, más de 9 días, más de 10 días, más de 15 días, más de 20 días, más de 25 días, más de 30 días, más de 35 días, más de 40 días, más de 45 días, más de 2 meses, más de 3 meses, más de 4 meses o más de 5 meses. El aumento de la semivida de los anticuerpos en un mamífero,  
 15 (por ejemplo, un ser humano), resulta en un título sérico más alto de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el mamífero, y por lo tanto, reduce la frecuencia de la administración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos y/o reduce la concentración de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a administrar. Los anticuerpos que tienen semividas aumentadas *in vivo* se pueden generar mediante técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, los anticuerpos con semividas aumentadas *in vivo* se pueden generar mediante  
 20 la modificación (por ejemplo, sustitución, eliminación o agregación) de restos de aminoácidos identificados como involucrados en la interacción entre el dominio Fc y el receptor FcRn (véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 97/34631; WO 04/029207; la patente de Estados Unidos n.º 6.737.056 y la publicación de patente de Estados Unidos n.º 2003/0190311 y analizadas con más detalle a continuación);

En varias realizaciones del procedimiento anterior, los anticuerpos pueden comprender modificaciones/sustituciones y/o nuevos aminoácidos dentro de sus dominios Fc tales como, por ejemplo, los develados en Ghetie y col., 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan y col., 1988, Nature 332:563-564; Lund y col., 1991, J. Immunol. 147:2657-2662; Lund y col., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre y col., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins y col., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA 92:11980-11984; Jefferis y col., 1995, Immunol Lett. 44:111-117; Lund y col., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis y col., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund y col., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour y col., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie y col., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy y col., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu y col., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie y col., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields y col., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis y col., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta y col., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490); las patentes de los EE.UU. n.º 5.624.821; 5.885.573; 5.677.425; 6.165.745; 6.277.375; 5.869.046; 6.121.022; 5.624.821; 5.648.260; 6.194.551; 6.737.056; 6.821.505; 6.277.375; la solicitud de patente de EE.UU. n.º 10/370.749 y las publicaciones PCT WO 94/2935; WO 99/58572; WO 00/42072; WO 02/060919, WO 04/029207; . Otras modificaciones/sustituciones del dominio Fc serán fácilmente evidentes para un experto en la materia.

Los anticuerpos pueden comprender modificaciones/sustituciones y/o nuevos restos de aminoácidos en sus regiones Fc que se pueden generar mediante numerosos procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Los ejemplos no limitantes incluyen, aislar regiones codificantes de anticuerpos (por ejemplo, de hibridoma) y hacer una o más sustituciones deseadas en la región Fc de la región codificante de anticuerpo aislada. Como alternativa, las regiones variables de un anticuerpo pueden subclonarse en un vector que codifica una región Fc que comprende una o modificaciones/sustituciones y/o nuevos restos de aminoácidos.

Los anticuerpos de varios aspectos también pueden modificarse para alterar la glucosilación, nuevamente para alterar una o más propiedades funcionales del anticuerpo.

En varias realizaciones, puede modificarse la glucosilación de los anticuerpos. Por ejemplo, se puede hacer un anticuerpo aglucosilado (es decir, el anticuerpo carece de glucosilación). La glucosilación se puede alterar, por ejemplo, para aumentar la afinidad del anticuerpo por un antígeno diana. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la alteración de uno o más sitios de glucosilación dentro de la secuencia del anticuerpo. Por ejemplo, se pueden hacer una o más sustituciones de aminoácidos que dan como resultado la eliminación de uno o más sitios de glucosilación de marco de región variable para eliminar así la glucosilación en ese sitio. Dicha aglucosilación puede aumentar la afinidad del anticuerpo por el antígeno. Dicho enfoque se describe con más detalle en las patentes de EE.UU. n.º 5.714.350 y 6.350.861;

Además, o como alternativa, se puede hacer un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glucosilación, tal como un anticuerpo hipofucosilado que tiene cantidades reducidas de restos de fucosilo o un anticuerpo que tiene estructuras bisectadas de GlcNAc aumentadas. Se ha demostrado que dichos patrones de glucosilación alterados aumentan la capacidad de anticuerpos de ADCC. Dichas modificaciones de carbohidratos se pueden lograr mediante, por ejemplo, la expresión del anticuerpo en una célula hospedadora con maquinaria de glucosilación alterada. Las células con maquinaria de glucosilación alterada se han descrito en la materia y se pueden utilizar como células

hospedadoras en las que expresar anticuerpos recombinantes para producir de este modo un anticuerpo con glucosilación alterada. Véase, por ejemplo, Shields, R. L. y col. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740; Umana y col. (1999) Nat. Biotech. 17:176-1, así como, la patente europea n.º: EP 1.176.195; las publicaciones PCT WO 03/035835; WO 99/54342;.

- 5 Los anticuerpos se pueden utilizar solos o en combinación con otras composiciones. Los anticuerpos pueden además fusionarse de forma recombinante con un polipéptido heterólogo en el extremo N o C o conjugarse químicamente (incluidas las conjugaciones covalentes y no covalentes) con polipéptidos u otras composiciones. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden fusionar de forma recombinante o conjugarse con moléculas útiles como marcadores en ensayos de detección y moléculas efectoras, tales como polipéptidos heterólogos, fármacos, radionúclidos o toxinas. Véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; la patente de Estados Unidos n.º 5.314.995; y EP 396.387;

10 Los anticuerpos pueden incluir derivados que se modifican, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo, de manera que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una a un polipéptido del GPR49 o un fragmento del mismo y/o genere una respuesta deseada. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero no se limitan a escisiones químicas específicas, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

15 En varios aspectos, los anticuerpos se unen específicamente a un polipéptido que comprende o consiste en un polipéptido del GPR49 que tiene al menos un 60 % de identidad, o al menos un 70 % de identidad, o al menos un 80 % de identidad, al menos un 85 % de identidad, al menos un 90 % de identidad, al menos un 95 % de identidad, o al menos al menos un 97 % de identidad, o al menos un 99 % de identidad, o el 100 % de identidad con el polipéptido del GPR49 humano del número de accesión NCBI NP\_003658.1 (SEQ ID NO: 1) o fragmentos de los mismos. Dichos fragmentos pueden, por ejemplo, ser al menos aproximadamente 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850 o 900 aminoácidos contiguos o no contiguos de la SEQ ID NO: 1, o cualquier número de aminoácidos contiguos o no contiguos entre cualquiera de las longitudes mencionadas anteriormente.

20 Se puede determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos (o dos secuencias de ácido nucleico), por ejemplo, mediante la alineación de las secuencias con fines de comparación óptimos (por ejemplo, se pueden introducir espacios en la secuencia de una primera secuencia). Luego se comparan los aminoácidos o nucleótidos en las posiciones correspondientes, y el porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de identidad = n.º de posiciones idénticas/n.º total de posiciones x 100). La comparación real de las dos secuencias se puede lograr mediante procedimientos bien conocidos, por ejemplo, utilizando un algoritmo matemático. Un ejemplo específico, no limitativo, de dicho algoritmo matemático se describe en Karlin y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:5873-5877 (1993), Dicho algoritmo está incorporado en los programas BLASTN y BLASTX (versión 2.2) como se describe en Schaffer y col., Nucleic Acids Res., 29:2994-3005 (2001),. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros predeterminados de los programas respectivos (por ejemplo, BLASTN). Véase <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, disponible el 10 de abril de 2002. En una realización, la base de datos buscada es una base de datos no redundante (NR), y los parámetros para la comparación de secuencias se pueden configurar para: sin filtros; valor esperado de 10; tamaño de palabra de 3; la matriz es BLOSUM62; y los costos del espacio tienen una existencia de 11 y una extensión de 1.

25 Varias realizaciones del procedimiento anterior también abarcan variantes de los anticuerpos descritos anteriormente, que incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación, que comprenden una o más sustituciones de restos de aminoácidos en el dominio variable ligero ( $V_L$ ) y/o dominio variable pesado ( $V_H$ ). Varios también abarcan variantes de los anticuerpos descritos anteriormente con una o más sustituciones de restos de aminoácidos adicionales en una o más CDR de  $V_L$  y/o una o más CDR de  $V_H$ . El anticuerpo generado mediante la introducción de sustituciones en el dominio  $V_H$ , CDR de  $V_H$ , dominio  $V_L$  y/o CDR de  $V_L$  de los anticuerpos descritos anteriormente se puede probar *in vitro* e *in vivo*, por ejemplo, su capacidad para unirse a GPR49 (mediante, por ejemplo, inmunoensayos que incluyen, pero no se limitan a ELISA y BIAcore).

30 En otras realizaciones del procedimiento anterior, los anticuerpos pueden tener al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis de las CDR de los anticuerpos descritos anteriormente, que incluye uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1,

9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

5 Varias realizaciones del procedimiento anterior incluyen anticuerpos que se unen específicamente a GPR49 que comprenden derivados de los dominios  $V_H$ , CDR de  $V_H$ , dominios  $V_L$  o CDR de  $V_L$  de anticuerpos anti-GPR49, tales como uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación, que se unen específicamente a GPR49. Se pueden utilizar técnicas estándar conocidas por los expertos en la materia para introducir mutaciones (por ejemplo, adiciones, deleciones y/o sustituciones) en la secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo, que incluyen, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR que se utilizan habitualmente para generar sustituciones de aminoácidos. En una realización, los derivados de CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  incluyen menos de 25 sustituciones de aminoácidos, menos de 20 sustituciones de aminoácidos, menos de 15 sustituciones de aminoácidos, menos de 10 sustituciones de aminoácidos, menos de 5 sustituciones de aminoácidos, menos de 4 sustituciones de aminoácidos, menos de 3 sustituciones de aminoácidos o menos de 2 sustituciones de aminoácidos con respecto a las CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  originales. En otra realización, los derivados de CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$  tienen sustituciones conservadoras de aminoácidos (por ejemplo, supra) hechas en uno o más restos de aminoácidos no esenciales predichos (es decir, restos de aminoácidos que no son críticos para que el anticuerpo se una específicamente a GPR49). Como alternativa, pueden introducirse mutaciones aleatoriamente a lo largo de toda o parte de la secuencia codificante de CDR de  $V_H$  y/o  $V_L$ , tal como mediante mutagénesis de saturación, y los mutantes resultantes se pueden seleccionar para determinar la actividad biológica para identificar los mutantes que retienen la actividad. Después de la mutagénesis, se puede expresar el anticuerpo codificado y se puede determinar la actividad del anticuerpo.

25 Varias realizaciones del procedimiento anterior también abarcan anticuerpos que se unen específicamente a GPR49 o un fragmento del mismo, comprendiendo dichos anticuerpos una secuencia de aminoácidos de una cadena pesada variable y/o cadena ligera variable que es al menos el 45%, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada y/o cadena ligera variable de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, incluido uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

35 Varias realizaciones del procedimiento anterior además abarcan anticuerpos que se unen específicamente a GPR49 o un fragmento del mismo, comprendiendo dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos una secuencia de aminoácidos de una o más CDR que es al menos el 45 %, al menos el 50 %, al menos el 55 %, al menos el 60 %, al menos el 65 %, al menos el 70 %, al menos el 75 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o al menos el 99 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de una o más CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento, incluido uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación. La determinación del porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos se puede determinar mediante cualquier procedimiento conocido por un experto en la materia, que incluye las búsquedas de proteínas BLAST.

50 Otra realización del procedimiento anterior incluye la introducción de sustituciones conservadoras de aminoácidos en cualquier porción de un anticuerpo anti-GPR49, tales como uno cualquiera de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación. Es bien conocido en la materia que la "sustitución conservadora de aminoácidos" se refiere a las sustituciones de aminoácidos que sustituyen aminoácidos funcionalmente equivalentes. Los cambios de aminoácidos conservativos dan lugar a cambios silenciosos en la secuencia de aminoácidos del péptido resultante. Por ejemplo, uno o más aminoácidos de polaridad similar actúan como equivalentes funcionales y producen una alteración silenciosa dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido. Las sustituciones que son de carga neutra y que reemplazan un residuo con un residuo más pequeño también pueden considerarse "sustituciones conservadoras" incluso si los restos están en diferentes grupos (por ejemplo, reemplazo de fenilalanina con la isoleucina más pequeña). Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la materia. En la Tabla 1 se muestran varias familias de sustituciones conservadoras de aminoácidos.



TABLA 1

Familias de sustituciones conservadoras de aminoácidos	
Familia	Aminoácidos
no polar	Trp, Phe, Met, Leu, Ile, Val, Ala, Pro
polar no cargada	Gly, Ser, Thr, Asn, Gln, Tyr, Cys
ácida/cargada negativamente	Asp, Glu
básica/cargada positivamente	Arg, Lys, His
Beta-ramificada	Thr, Val, Ile
restos que influyen en la orientación de la cadena	Gly, Pro
aromática	Trp, Tyr, Phe, His

La expresión "sustitución conservadora de aminoácidos" también se refiere a la utilización de análogos o variantes de aminoácidos.

#### Procedimientos de generación de anticuerpos

- 5 Los anticuerpos que se unen específicamente a un polipéptido del GPR49 se pueden identificar, por ejemplo, mediante inmunoensayos, BIAcore u otras técnicas conocidas por los expertos en la materia.

Los anticuerpos de varias realizaciones pueden generarse mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la materia. Los anticuerpos policlonales para un antígeno de interés se pueden producir mediante diversos procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, se puede administrar un polipéptido del GPR49 a varios animales hospedadores, incluidos, pero sin limitarse a, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Se pueden utilizar varios adyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, que depende de la especie hospedadora, e incluyen, pero no se limitan a, los geles minerales de Freund (completos e incompletos) como el hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y adyuvantes humanos potencialmente útiles como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *Corynebacterium parvum*. Dichos adyuvantes también son bien conocidos en la materia.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar utilizando una amplia variedad de técnicas conocidas en la materia, que incluyen la utilización de tecnologías de hibridoma recombinante y presentación de fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando técnicas de hibridoma que incluyen las conocidas en la materia y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681* (Elsevier, N.Y., 1981);. La expresión "anticuerpo monoclonal" (abreviado como "Abm") como se usa en el presente documento no se limita a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que procede de un solo clon, que incluye cualquier clon eucariota, procarionota o fago, y no el procedimiento por el cual se produce. Un "anticuerpo monoclonal" puede comprender, o alternativamente consistir en, dos proteínas, es decir, una cadena pesada y una ligera.

Los procedimientos para producir y seleccionar anticuerpos específicos utilizando tecnología de hibridoma son rutinarios y bien conocidos en la materia. En un ejemplo no limitante, pueden inmunizarse ratones con un polipéptido del GPR49 o una célula que exprese dicho péptido. Una vez que se detecta una respuesta inmune, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero del ratón, se extrae el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Luego se fusionan los esplenocitos mediante técnicas bien conocidas con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponibles en la ATCC. Se seleccionan y se clonan los hibridomas por dilución limitada. Se ensayan luego los clones de hibridoma mediante procedimientos conocidos en la materia para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido del GPR49. El fluido de ascitis, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, se puede generar mediante la inmunización de ratones con clones de hibridoma positivos.

Por consiguiente, varias realizaciones proporcionan procedimientos para generar anticuerpos monoclonales, así como anticuerpos producidos por el procedimiento que comprende cultivar una célula de hibridoma que secreta un anticuerpo en el que el hibridoma se genera mediante la fusión de esplenocitos aislados de un ratón inmunizado con un antígeno GPR49 con células de mieloma y luego se seleccionan los hibridomas resultantes de la fusión para clones de hibridomas que secretan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido del GPR49.

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos pueden generarse mediante técnicas conocidas. Por ejemplo, los fragmentos Fab y F(ab')<sub>2</sub> de varias realizaciones pueden producirse mediante escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, utilizando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')<sub>2</sub>). Los fragmentos F(ab')<sub>2</sub> contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CH1 de la cadena pesada.

Los anticuerpos de diversas realizaciones también se pueden generar utilizando diversos procedimientos de presentación de fagos conocidos en la materia. En los procedimientos de presentación de fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentaron en la superficie de las partículas de fagos que llevan las secuencias de polinucleótidos que las codifican. En una realización particular, dicho fago se puede utilizar para presentar dominios de unión a antígeno expresados a partir de un repertorio o biblioteca de anticuerpos combinatoria (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígeno que se une al antígeno de interés se pueden seleccionar o identificar con antígeno, por ejemplo, utilizando un antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o perla. Los fagos utilizados en estos procedimientos son normalmente fagos filamentosos que incluyen dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpos Fv estabilizados con Fab, Fv o disulfuro fusionados de forma recombinante con el gen del fago III o la proteína del gen VIII. Los ejemplos de procedimientos de presentación de fagos que se pueden utilizar para hacer los anticuerpos de varias realizaciones incluyen los desvelados en la solicitud PCT N.º PCT/GB91/01134; las publicaciones PCT WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y las patentes de EE.UU. N.º 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108;.

Como se describe en las referencias anteriores, después de la selección del fago, las regiones codificantes de anticuerpos del fago se pueden aislar y utilizar para generar anticuerpos completos, incluidos anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión al antígeno deseado, y expresar en cualquier hospedador deseado, incluyendo células de mamíferos, células de insectos, células vegetales, levaduras u bacterias, por ejemplo, como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también se pueden emplear técnicas para producir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' y F(ab')<sub>2</sub> utilizando procedimientos conocidos en la materia, como los desvelados en la publicación PCT WO 92/22324; Mullinax y col., BioTechniques 12(6):864-869 (1992); y Sawai y col., AJRI 34:26-34 (1995); y Better y col., Science 240:1041-1043 (1988),

Los ejemplos de técnicas que se pueden utilizar para producir anticuerpos y Fv de cadena única incluyen los descritos en las patentes de EE.UU. n.º 4.946.778 y 5.258.498; Huston y col., Methods in Enzymology 203:46-88 (1991); Shu y col., PNAS 90:7995-7999 (1993); y Skerra y col., Science 240:1038-1040 (1988)

#### Anticuerpos humanos y humanización de anticuerpos

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser deseable utilizar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo proceden de diferentes especies animales, tales como anticuerpos que tienen una región variable procedente de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Los procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, Morrison, Science 229:1202 (1985); Oi y col., BioTechniques 4:214 (1986); Gillies y col., (1989) J. Immunol. Methods 125:191-202; las patentes de los EE.UU. n.º 5.807.715; 4.816.567; y 4.816.397; Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tiene una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de las especies no humanas y una región marco de una molécula de inmunoglobulina humana. A menudo, los restos marco en las regiones marco humanas se sustituirán con el resto correspondiente del anticuerpo donante de CDR para alterar, preferentemente mejorar, la unión del antígeno. Estas sustituciones de marco se identifican mediante procedimientos bien conocidos en la materia, por ejemplo, mediante el modelado de las interacciones de las CDR y los restos marco para identificar restos marco importantes para la unión de antígenos y la comparación de secuencias para identificar restos marco inusuales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo, Queen y col., la patente de Estados Unidos n.º 5.585.089; Riechmann y col., Nature 332:323 (1988);

Los anticuerpos humanos evitan algunos de los problemas asociados con los anticuerpos que poseen regiones variables y/o constantes murinas o de rata. La presencia de dichas proteínas procedentes de ratas o murinas puede llevar a la rápida eliminación de los anticuerpos o puede llevar a la generación de una respuesta inmunitaria contra el anticuerpo por parte de un paciente. Con el fin de evitar la utilización de anticuerpos murinos o procedentes de rata, los anticuerpos se pueden humanizar utilizando una variedad de técnicas conocidas en la materia que incluyen, por ejemplo, injerto de CDR (EP 239.400; publicación PCT WO 91/09967; las patentes de los EE.UU. n.º 5.225.539; 5.530.101; y 5.585.089), rechapado o rebarnizado (EP 592.106; EP 519.596; Padlan, Molecular Immunology 28(4/5):489-498 (1991); Studnicka y col., Protein Engineering 7(6):805-814 (1994); Roguska. y col., PNAS 91:969-973 (1994)), desinmunización (publicación de patente de EE.UU. n.º 20030153043) e intercambio de cadenas (patente de EE.UU. n.º 5.565.332),

Se pueden utilizar anticuerpos completamente humanos para el tratamiento terapéutico de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos se pueden producir mediante una variedad de procedimientos conocidos en la materia, que incluyen los procedimientos de presentación de fagos descritos anteriormente utilizando bibliotecas de anticuerpos procedentes de secuencias de inmunoglobulina humana. Véase también, las patentes de Estados Unidos n.º 4.444.887 y 4.716.111; y las publicaciones PCT WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735 y WO 91/10741,

Los anticuerpos humanos también se pueden producir utilizando ratones transgénicos que son incapaces de

expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera humanos pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Como alternativa, la región variable, la región constante y la región de diversidad humana pueden introducirse en células madre embrionarias de ratón además de los genes de la cadena pesada y ligera humana. Los genes de inmunoglobulina de cadena pesada y ligera de ratón pueden volverse no funcionales por separado o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la eliminación homocigota de la región JH evita la producción de anticuerpos endógenos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Los ratones quiméricos se crían para producir descendientes homocigotos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, todo o una porción de un polipéptido del GPR49. Se pueden obtener anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de ratones transgénicos inmunizados utilizando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana albergados por los ratones transgénicos se reorganizan durante la diferenciación de los linfocitos B y, posteriormente, se someten a cambio de clase y mutación somática. Por lo tanto, utilizando dicha técnica, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una descripción general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93 (1995), Para una discusión detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y los protocolos para producir dichos anticuerpos, véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 98/24893; WO 92/01047; WO 96/34096; WO 96/33735; la patente europea n.º 0 598 877; las patentes de los EE.UU. n.º 5.413.923; 5.625.126; 5.633.425; 5.569.825; 5.661.016; 5.545.806; 5.814.318; 5.885.793; 5.916.771; y 5.939.598; Además, compañías como Abgenix, Inc. (Fremont, CA) y Genpharm (San Jose, CA) pueden participar para proporcionar anticuerpos humanos dirigidos contra un antígeno seleccionado utilizando una tecnología similar a la descrita anteriormente. Abgenix, Inc. (Fremont, CA) proporciona cepas Xenomouse® de ratones que han sido diseñados por ingeniería genética para contener hasta un tamaño de 1000 kb de fragmentos configurados en la línea germinal del locus de la cadena pesada humana y el locus de la cadena ligera kappa. Véase Mendez y col. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997) y Green y Jakobovits J. *Exp. Med.* 188:483-495 (1998).

En un enfoque alternativo, otros, incluido GenPharm International, Inc., han utilizado un enfoque de "minilocus". En el enfoque de minilocus, un locus de Ig exógeno se imita mediante la inclusión de piezas (genes individuales) del locus de Ig. Por lo tanto, uno o más genes V<sub>H</sub>, uno o más genes D<sub>H</sub>, uno o más genes J<sub>H</sub>, una región constante mu, y usualmente una segunda región constante (preferentemente una región constante gamma) se forman en una construcción para la inserción en un animal. Este enfoque se describe en la patente de EE.UU. n.º 5.545.807 de Surani y col. y las patentes de EE.UU. N.º 5.545.806; 5.625.825, 5.625.126, 5.633.425, 5.661.016, 5.770.429, 5.789.650, 5.814.318, 5.877.397, 5.874.299 y 6.255.458 de Lonberg y Kay, las patentes de los Estados Unidos n.º 5.591.669 y 6.023.010 de Krimpenfort y Berns, las patentes de Estados Unidos n.º 5.612.205, 5.721.367 y 5.789.215 de Berns y col. y la patente de los Estados Unidos n.º 5.643.763 de Choi y Dunn y las solicitudes de patente de los Estados Unidos de GenPharm International n.º 07/574.748, presentada el 29 de agosto de 1990, 07/575.962, presentada el 31 de agosto de 1990, 07/810.279, presentada el 17 de diciembre de 1991, 07/853.408, presentada el 18 de marzo de 1992, 07/904.068, presentada el 23 de junio de 1992, 07/990.860, presentada el 16 de diciembre de 1992, 08/053.131, presentada el 26 de abril de 1993, 08/096.762, presentada el 22 de julio de 1993, 08/155.301, presentada el 18 de noviembre de 1993, 08/161.739, presentada el 3 de diciembre de 1993, 08/165.699, presentada el 10 de diciembre de 1993, 08/209.741, presentada el 9 de marzo de 1994. Véase también la patente europea n.º 0 546 073 B1, las publicaciones de patente internacional n.º WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 y WO 98/24884 la patente de los Estados Unidos n.º 5.981.175, Véase además, Taylor y col., 1992, Chen y col., 1993, Tuailon y col., 1993, Choi y col., 1993, Lonberg y col., (1994), Taylor y col., (1994), y Tuailon y col., (1995), Fishwild y col., (1996),.

Los anticuerpos humanos se pueden producir a partir de ratones transgénicos que han tenido grandes trozos de cromosomas o cromosomas enteros introducidos a través de la fusión de microcélulas. Véase las Solicitudes de Patente Europea n.º 773 288 y 843 961. Además, se han generado ratones KM™, que son el resultado del cruce de ratones Tc con ratones minilocus (HuAbm) de Medarex. Estos ratones poseen el transcromosoma de IgH humana de los ratones Kirin y el transgén de la cadena kappa de los ratones Genpharm (Ishida y col., *Cloning Stem Cells*, (2002) 4:91-102).

Los anticuerpos completamente humanos que reconocen un epítipo seleccionado se pueden generar utilizando una técnica denominada "selección guiada". En este enfoque, se utiliza un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers y col., *Bio/technology* 12:899-903 (1988),).

Además, los anticuerpos contra los polipéptidos GPR49 pueden, a su vez, utilizarse para generar anticuerpos anti-idiotipo que "imitan" a los polipéptidos GPR49 utilizando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Greenspan & Bona, *FASEB J.* 7(5):437-444; (1989) y Nissinoff, J. *Immunol.* 147(8):2429-2438 (1991);

En varias realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento se pueden utilizar terapéuticamente *in vivo*. Por consiguiente, el anticuerpo se puede modificar para hacerlo menos inmunogénico en el

individuo. Por ejemplo, si el individuo es humano, el anticuerpo se puede "humanizar" cuando la región o regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo se trasplantan a un anticuerpo humano (por ejemplo, como se describe en Jones y col., *Nature* 321:522-525, 1986; y Tempest y col., *Biotechnology* 9:266-273, 1991).

- 5 La tecnología de presentación de fagos también se puede utilizar para seleccionar genes de anticuerpos con actividades de unión hacia el polipéptido de repertorios de genes v amplificados por PCR de linfocitos de seres humanos seleccionados para detectar anticuerpos anti-GPR49 o de bibliotecas previas (McCafferty y col., *Nature* 348:552-554, 1990; y Marks, y col., *Biotechnology* 10:779-783, 1992). La afinidad de estos anticuerpos también se puede mejorar mediante el intercambio de cadenas (Clackson y col., *Nature* 352: 624-628, 1991).

#### Procedimientos de producción de anticuerpos

- 10 Los anticuerpos de varias realizaciones se pueden producir mediante cualquier procedimiento conocido en la materia para la síntesis de anticuerpos, en particular, mediante síntesis química o, preferentemente, mediante técnicas de expresión recombinante.

- 15 La expresión recombinante de un anticuerpo o fragmento, procedente o análogo del mismo, (por ejemplo, una cadena pesada o ligera de un anticuerpo o un anticuerpo de cadena simple), requiere la construcción de un vector de expresión que contenga un polinucleótido que codifique el anticuerpo. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica una molécula de anticuerpo o una cadena pesada o ligera de un anticuerpo, o una porción de la misma (preferentemente que contiene el dominio variable de la cadena pesada o ligera), el vector para la producción de la molécula de anticuerpo puede producirse mediante tecnología de ADN recombinante que utiliza técnicas bien conocidas en la materia. Por lo tanto, los procedimientos para preparar una proteína mediante la expresión de un polinucleótido que contiene un anticuerpo que codifica una secuencia de nucleótidos se describen en el presente documento. Los procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la materia se pueden utilizar para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de anticuerpos y señales de control de transcripción y traducción apropiadas. Estos procedimientos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Diversas realizaciones proporcionan de este modo vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo, o una cadena pesada o ligera de la misma, o un dominio variable de cadena pesada o ligera, unido operativamente a un promotor. Tales vectores pueden incluir la secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la molécula de anticuerpo (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 86/05807; la publicación PCT WO 89/01036; y la patente de Estados Unidos n.º 5.122.464;) y el dominio variable del anticuerpo puede clonarse en dicho vector para la expresión de toda la cadena pesada o ligera.
- 20
- 25
- 30

- El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora mediante técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan luego mediante técnicas convencionales para producir un anticuerpo. Por lo tanto, varias realizaciones incluyen células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un anticuerpo, o una cadena pesada o ligera del mismo, o un anticuerpo de cadena única, unido operativamente a un promotor heterólogo. Los vectores que codifican las cadenas pesada y ligera pueden expresarse conjuntamente en la célula hospedadora para la expresión de la molécula de inmunoglobulina completa, como se detalla a continuación.
- 35

- Puede utilizarse una variedad de sistemas de vectores de expresión del hospedador para expresar las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento. Dichos sistemas de expresión del hospedador representan vehículos mediante los cuales las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar una molécula de anticuerpo *in situ*. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos como bacterias (por ejemplo, *E. coli*, *B. subtilis*) transformados con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmido que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, el virus del mosaico de la coliflor, CaMV; el virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformado con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de anticuerpos; o sistemas celulares de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0, 3T3, PerC6) que albergan construcciones de expresión recombinante que contienen promotores procedentes del genoma de células de mamíferos (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamíferos (por ejemplo, el promotor del adenovirus tardío; el promotor 7.5K del virus de la vacuna). Se pueden utilizar células bacterianas como *Escherichia coli* y células eucariotas para la expresión de una molécula de anticuerpo recombinante. Por ejemplo, las células de mamíferos, como las células de ovario de hámster chino (CHO), junto con un vector, como el elemento promotor del gen temprano intermedio principal del citomegalovirus humano, son un sistema de expresión eficaz para anticuerpos (Foecking y col., *Gene* 45:101 (1986); Cockett y col., *Bio/Technology* 8:2 (1990)). Asimismo, véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.827.739, 5.879.936, 5.981.216 y 5.658.759.
- 40
- 45
- 50
- 55

- En sistemas bacterianos, se pueden seleccionar ventajosamente varios vectores de expresión dependiendo de la utilización pretendida para la molécula de anticuerpo que se está expresando. Por ejemplo, cuando se debe producir
- 60

una gran cantidad de dicha proteína, para la generación de composiciones farmacéuticas de una molécula de anticuerpo, pueden ser deseables vectores que dirigen la expresión de altos niveles de productos de proteínas de fusión que se purifican fácilmente. Dichos vectores incluyen, pero no se limitan, al vector de expresión de *E. coli* pUR278 (Ruther y col., EMBO J. 2: 1791 (1983)), en el que la secuencia codificante del anticuerpo puede ligarse individualmente en el vector en el marco con la región codificante lacZ de modo que se produce una proteína de fusión; vectores pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109 (1985); Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24:5503-5509 (1989)); y similares. Los vectores pGEX también pueden utilizarse para expresar polipéptidos extraños como proteínas de fusión con glutatión S-transferasa (GST). En general, tales proteínas de fusión son solubles y se pueden purificar fácilmente a partir de células lisadas mediante adsorción y unión a las perlas de glutatión-agarosa de la matriz, seguido de la elución en presencia de glutatión libre. Los vectores pGEX están diseñados para incluir sitios de escisión de proteasa de trombina o factor Xa de modo que el producto génico diana clonado se pueda liberar de la fracción GST.

En un sistema de insectos, el virus de la polihedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) se utiliza como un vector para expresar genes extraños. El virus crece en células de *Spodoptera frugiperda*. La secuencia codificante del anticuerpo puede clonarse individualmente en regiones no esenciales (por ejemplo, el gen de la polihedrina) del virus y colocarse bajo el control de un promotor de AcNPV (por ejemplo, el promotor de la polihedrina).

En células hospedadoras de mamíferos, pueden utilizarse varios sistemas de expresión basados en virus. En los casos en que se utiliza un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante del anticuerpo de interés puede ligarse a un complejo de control de transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. Este gen quimérico puede luego insertarse en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en hospedadores infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359 (1984)). También pueden requerirse señales de iniciación específicas para la traducción eficaz de secuencias codificantes de anticuerpos insertadas. Estas señales incluyen el codón de iniciación ATG y las secuencias adyacentes. Además, el codón de iniciación debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para asegurar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de traducción exógenas y codones de iniciación pueden ser de una variedad de orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficacia de la expresión puede mejorarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bittner y col., Methods in Enzymol. 153:51-544 (1987)).

Además, se puede elegir una cepa de la célula hospedadora que modula la expresión de las secuencias insertadas, o modifica y procesa el producto génico en la forma específica deseada. Dichas modificaciones (por ejemplo, glucosilación) y el procesamiento (por ejemplo, escisión) de los productos proteicos pueden ser importantes para la función de la proteína. Diferentes células hospedadoras tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y la modificación post-traduccionales de proteínas y productos genéticos. Se pueden elegir líneas celulares o sistemas hospedadores apropiados para garantizar la correcta modificación y procesamiento de la proteína extraña expresada. Para este fin, se pueden utilizar células hospedadoras eucariotas que poseen la maquinaria celular para el procesamiento adecuado de la transcripción primaria, la glucosilación y la fosforilación del producto génico. Dichas células hospedadoras de mamíferos incluyen, pero no se limitan a, CHO, VERY, BHK, Hela, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, NS0, Per.C6 y en particular, líneas celulares de cáncer de mama tales como, por ejemplo, BT483, Hs578T, HTB2, BT20 y T47D, y líneas celulares de glándulas mamarias normales tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst.

Para la producción a largo plazo y de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se puede utilizar una expresión estable. Por ejemplo, pueden diseñarse líneas celulares que expresan de manera estable la molécula de anticuerpo. En lugar de utilizar vectores de expresión que contienen orígenes virales de replicación, las células hospedadoras se pueden transformar con ADN controlado por elementos de control de expresión apropiados (por ejemplo, promotores, potenciadores, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, las células modificadas pueden crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y luego se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante confiere resistencia a la selección y permite a las células integrar de manera estable el plásmido en sus cromosomas y crecer para formar focos que a su vez se pueden clonar y expandir en líneas celulares. Este procedimiento puede utilizarse ventajosamente para diseñar líneas celulares que expresan la molécula de anticuerpo. Dichas líneas celulares diseñadas pueden ser particularmente útiles en la selección y evaluación de compuestos que interactúan directa o indirectamente con la molécula de anticuerpo.

Se pueden utilizar varios sistemas de selección, que incluyen, pero no se limitan a, la timidina quinasa del virus del herpes simple (Wigler y col., Cell 11: 223 (1977)), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska y Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:202 (1992)), y la adenina fosforribosiltransferasa (Lowy y col., Cell 22: 817 (1980)) que pueden emplearse en las células tk, hgprt o aprt, respectivamente. Asimismo, se puede utilizar la resistencia a los antimetabolitos como la base para la selección de los siguientes genes: dhfr, que confiere resistencia al metotrexato (Wigler y col., Proc Natl. Acad. Sci. USA 77: 357 (1980); O'Hare y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527 (1981)); gpt, que confiere resistencia al ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072 (1981)); neo, que confiere resistencia al aminoglucósido G-418 Clinical Pharmacy 12:488-505; Wu y

Wu, *Biotherapy* 3:87-95 (1991); Tolstoshev, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596 (1993); Mulligan, *Science* 260:926-932 (1993); y Morgan y Anderson, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217 (1993); Mayo de 1993, *TIB TECH* 11(5): 155-215); e higo, que confiere resistencia a la higromicina (Santerre y col., *Gene* 30:147 (1984)). Los procedimientos comúnmente conocidos en la materia de la tecnología de ADN recombinante pueden aplicarse de forma rutinaria para seleccionar el clon recombinante deseado, y se describen tales procedimientos, por ejemplo, en Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, *Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual*, Stockton Press, NY (1990); y en los capítulos 12 y 13, Dracopoli y col. (eds), *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin y col., *J. Mol. Biol.* 150:1 (1981),

Los niveles de expresión de una molécula de anticuerpo se pueden aumentar mediante la amplificación del vector (para una revisión, véase Bebbington y Hentschel, *The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning*, Vol. 3. (Academic Press, New York, 1987),). Cuando un marcador en el sistema vectorial que expresa anticuerpos es amplificable, el aumento en el nivel de inhibidor presente en el cultivo de la célula hospedadora aumentará el número de copias del gen marcador. Dado que la región amplificada está asociada con el gen del anticuerpo, la producción del anticuerpo también aumentará (Crouse y col., *Mol. Cell. Biol.* 3:257 (1983),).

La célula hospedadora puede cotransfectarse con dos vectores de expresión, el primer vector que codifica un polipéptido procedente de la cadena pesada y el segundo vector que codifica un polipéptido procedente de la cadena ligera. Los dos vectores pueden contener marcadores seleccionables idénticos que permiten la expresión igual de polipéptidos de cadena pesada y ligera. Como alternativa, se puede utilizar un solo vector que codifica, y es capaz de expresar, polipéptidos de cadena pesada y ligera. En tales situaciones, la cadena ligera debe colocarse antes de la cadena pesada para evitar un exceso de cadena pesada libre tóxica (Proudfoot, *Nature* 322: 562 (1986); Kohler, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:2197 (1980),). Las secuencias codificantes para las cadenas pesada y ligera pueden comprender ADNc o ADN genómico.

Una vez que un animal, sintetizado químicamente o expresado de forma recombinante, ha producido una molécula de anticuerpo, se puede purificar mediante cualquier procedimiento conocido en la materia para la purificación de una molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, mediante cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, de afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la proteína A, y por cromatografía en columna de tamaño), centrifugación, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica estándar para la purificación de proteínas. Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar a secuencias polipeptídicas heterólogas descritas en el presente documento o conocidas de otro modo en la materia, para facilitar la purificación.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido hexa-histidina, como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:821-824 (1989), , por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta "HA", que corresponde a un epítipo procedente de la proteína de la hemaglutinina de la influenza (Wilson y col., *Cell* 37: 767 (1984),) y el marcador "flag".

Los anticuerpos descritos en el presente documento incluyen derivados que se modifican (por ejemplo, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo). Por ejemplo, pero no a modo de limitación, los derivados de anticuerpos incluyen anticuerpos que se han modificado, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, pegilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueadores conocidos, escisión proteolítica, enlace a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, que incluyen, pero sin limitar a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Además, el derivado puede contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos con semividas aumentadas *in vivo* se pueden generar uniéndose a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos moléculas de polímeros tales como polietilenglicol de alto peso molecular (PEG). El PEG se puede unir a dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos con o sin un enlazador multifuncional, ya sea a través de la conjugación específica del sitio del PEG al extremo N o C de dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos o a través de grupos épsilon-amino presentes en los restos de lisina. Se utilizará una derivación polimérica lineal o ramificada que dé como resultado una pérdida mínima de actividad biológica. El grado de conjugación se controlará de cerca por SDS-PAGE y espectrometría de masas para asegurar la conjugación adecuada de las moléculas de PEG a los anticuerpos. El PEG sin reaccionar se puede separar de los conjugados anticuerpo-PEG mediante, por ejemplo, cromatografía de exclusión por tamaño o de intercambio iónico.

Además, los anticuerpos se pueden conjugar con albúmina para hacer que el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo sea más estable *in vivo* o tengan una semivida más larga *in vivo*. Las técnicas son bien conocidas en la materia, véase, por ejemplo, las publicaciones internacionales n.º WO 93/15199, WO 93/15200 y WO 01/77137; y la

patente europea n.º EP 413.622,. Las realizaciones proporcionadas en el presente documento abarcan la utilización de anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados o fusionados a uno o más fracciones, que incluyen, pero sin limitación, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas.

5 Varias realizaciones abarcan la utilización de anticuerpos o fragmentos de los mismos fusionados de forma recombinante o conjugados químicamente (incluidas las conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento de los mismos, específicamente a un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los  
10 mismos se pueden fusionar de forma recombinante o conjugar químicamente (incluidas las conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) a una proteína o polipéptido heterólogo (o fragmento de los mismos, específicamente a un polipéptido de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 90 o al menos aproximadamente 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. La fusión no necesariamente tiene que ser  
15 directa, pero puede ocurrir a través de secuencias de enlace. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden utilizar para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos celulares particulares, ya sea *in vitro* o *in vivo*, mediante la fusión o conjugación de los anticuerpos con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. Los anticuerpos fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos también se pueden utilizar en inmunoensayos *in vitro* y procedimientos de purificación utilizando polipéptidos conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 93/21232; la patente europea n.º EP 439.095; Naramura y col., 1994, Immunol. Lett. 39:91-99; la patente de Estados Unidos n.º 5.474.981; Gillies y col., 1992, PNAS 89:1428-1432; y Fell y col., 1991, J. Immunol. 146:2446-2452,

25 Varias realizaciones incluyen formulaciones que comprenden proteínas, péptidos o polipéptidos heterólogos fusionados o conjugados con fragmentos de anticuerpos. Por ejemplo, los polipéptidos heterólogos pueden fusionarse o conjugarse con un fragmento Fab, un fragmento Fd, un fragmento Fv, un fragmento F(ab)<sub>2</sub>, un dominio VH, un dominio VL, una CDR de VH, una CDR de VL o fragmentos de los mismos. Los procedimientos para fusionar o conjugar polipéptidos con porciones de anticuerpos son bien conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos N.º 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851 y 5.112.946; las patentes de Estados Unidos N.º EP 307.434 y EP 367.166; las publicaciones internacionales n.º WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539; Zheng y col., 1995, J. Immunol. 154:5590-5600; y Vil y col., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:11337-11341,

35 Se pueden generar proteínas de fusión adicionales de anticuerpos que se unen específicamente a GPR49 o fragmentos de los mismos (por ejemplo, supra) a través de las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones y/o transposición de codones (colectivamente denominado "barajado de ADN"). El barajado de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los anticuerpos o fragmentos de los mismos (por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos con afinidades más altas y menores tasas de disociación). Véase, generalmente, las patentes de los EE.UU. n.º 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Patten y col., 1997, Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82; Hansson, y col.,  
40 1999, J. Mol. Biol. 287:265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24(2): 308-313,. Los anticuerpos o fragmentos de los mismos, o los anticuerpos codificados o fragmentos de los mismos, pueden alterarse sometiéndose a mutagénesis aleatoria mediante PCR propensa a errores, inserción de nucleótidos aleatorios u otros procedimientos antes de la recombinación. Una o más porciones de un polinucleótido que codifica un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, cuyas porciones se unen específicamente a un C/CLP pueden recombinarse con uno o  
45 más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden fusionar con secuencias marcadoras, tales como un péptido para facilitar la purificación. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del marcador es un péptido hexa-histidina, como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otros, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tal como se describe en Gentz y col., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, , por ejemplo, la hexa-histidina proporciona una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero no se limitan a, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo procedente de la proteína de la hemaglutinina de la influenza (Wilson y col., 1984, Cell 37:767, que se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad) y la etiqueta "flag".

55 Varias realizaciones abarcan además anticuerpos o fragmentos de los mismos conjugados con un agente de diagnóstico o terapéutico. Los anticuerpos se pueden utilizar para diagnóstico para, por ejemplo, monitorear el desarrollo o la progresión de un tumor como parte de un procedimiento de prueba clínica para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante el acoplamiento del anticuerpo a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas,  
60 grupos protésicos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al

anticuerpo (o fragmento del mismo) o indirectamente, a través de un intermedio (como, por ejemplo, un enlazador conocido en la materia) utilizando técnicas conocidas en la materia. Véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.741.900, para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para su uso como diagnóstico. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos protésicos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y ecuorina; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen, pero sin limitación, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In o <sup>99</sup>Tc, además, los metales emisores de positrones que utilizan diversas tomografías de emisión de positrones, los iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y las moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos se pueden conjugar con los anticuerpos descritos en el presente documento.

Además, un anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ion metálico radiactivo, por ejemplo, emisores alfa como, por ejemplo, <sup>213</sup>Bi. Una citotoxina o un agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para las células. Los ejemplos incluyen paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracenodiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbacina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucil, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfán, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cisplatino cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), antraciclinas (por ejemplo, daunorrubicina (antes daunomicina) y doxorrubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC) y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Se puede encontrar una lista más extensa de fracciones terapéuticas en la publicación PCT WO 03/075957.

Los conjugados se pueden utilizar para modificar una respuesta biológica dada, el agente terapéutico o la fracción de fármaco no debe interpretarse como limitado a los agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, la fracción de fármaco puede ser una proteína o polipéptido que posee una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, un agente apoptótico o un agente antiangiogénico.

Los anticuerpos también pueden unirse a soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero no se limitan a, vidrio, celulosa, poliacrilamida, nailon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

Las técnicas para conjugar dicha fracción terapéutica con anticuerpos son bien conocidas, véase, por ejemplo, Amon y col., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld y col. (eds.), pág. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom y col., "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson y col. (eds.), pág. 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 y col. (eds.), pág. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin y col. (eds.), pág. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe y col., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62:119-58 (1982),.

Los anticuerpos se pueden conjugar con otros polipéptidos. Los procedimientos para fusionar o conjugar anticuerpos a fracciones polipeptídicas son conocidos en la materia. Véase, por ejemplo, las patentes de los EE.UU. n.º 5.336.603; 5.622.929; 5.359.046; 5.349.053; 5.447.851 y 5.112.946; EP 307.434; EP 367.166; las publicaciones PCT WO 96/04388 y WO 91/06570; Ashkenazi y col., 1991, PNAS USA 88:10535; Zheng y col., 1995, J Immunol 154:5590; y Vil y col., 1992, PNAS USA 89:11337,. La fusión de un anticuerpo a una fracción no necesariamente tiene que ser directa, pero puede ocurrir a través de secuencias de enlace. Dichas moléculas enlazadoras son comúnmente conocidas en la materia y se describen en Denardo y col., 1998, Clin Cancer Res 4:2483; Peterson y col., 1999, Bioconjug Chem 10:553; Zimmerman y col., 1999, Nucl Med Biol 26:943; Garnett, 2002, Adv Drug Deliv Rev 53:171. Como alternativa, un anticuerpo se puede conjugar con un segundo anticuerpo para formar un heteroconjugado de anticuerpo como se describe por Segal en la patente de EE.UU. n.º 4.676.980,

#### Bloqueo del crecimiento de células madre cancerosas con anticuerpos anti-GPR49

Se han elaborado varias realizaciones para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas con anticuerpos anti-GPR49 como se detalla anteriormente. En algunos aspectos, un procedimiento para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 a las células madre cancerosas, en el que la cantidad eficaz del anticuerpo anti-GPR49 es suficiente para reducir el crecimiento de las células madre cancerosas. En algunos aspectos, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 se administra a las células madre cancerosas *in vitro*. En otros aspectos, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 se administra a las células madre cancerosas *in vivo*.



Como se utiliza en el presente documento, la expresión "células madre cancerosas" se refiere a una célula que puede proliferar de manera extensa o indefinida y dar lugar a una gran proporción de células cancerosas en un cáncer. En algunos aspectos, la gran proporción de células cancerosas representa la mayoría de las células cancerosas en un cáncer dado. Para ilustrar, pero no como limitación, una célula(s) madre cancerosas pueden ser el fundador de un tumor o un progenitor de las células cancerosas que comprenden la mayor parte de la masa de un cáncer.

Sin pretender quedar vinculados a teoría alguna, una célula madre cancerosa puede tener una variedad de propiedades celulares. Por ejemplo, una célula madre cancerosa puede volver a crecer un tumor como lo demuestra mediante su capacidad para formar tumores en un mamífero inmunocomprometido, como un ratón, y puede formar tumores tras el trasplante en serie subsiguiente en un mamífero inmunocomprometido, como un ratón. Las células madre cancerosas pueden dividirse de forma asimétrica y simétrica y pueden mostrar tasas variables de proliferación. Además, una célula madre cancerosa puede crecer *in vitro* bajo condiciones establecidas de células madre cancerosas, como en un medio sin suero y/o en suspensión o en placas de baja adherencia.

Ejemplos de células madre cancerosas cuyo crecimiento puede ser bloqueado por anticuerpos anti-GPR49 incluyen células madre cancerosas de leucemias, tales como leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas, tales como, leucemias mieloblásticas, promielocíticas, mielomonocíticas, monocíticas y eritroleucemia y síndrome mielodisplásico (SMD); leucemias crónicas, tales como, pero no limitado a, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia de células pilosas; policitemia vera; linfomas como, pero no limitados a, la enfermedad de Hodgkin, enfermedad no Hodgkin; mielomas múltiples como, pero no limitados a, mieloma múltiple latente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom; gammapatía monoclonal de importancia indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de la cadena pesada; sarcomas óseos y de tejido conjuntivo como, pero no limitados a, sarcoma óseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor maligno de células gigantes, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma perióstico, sarcomas de tejidos blandos, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomas, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero no limitados a, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma, linfoma cerebral primario; cáncer de mama que incluye, pero sin limitar a, carcinoma ductal, adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget y cáncer de mama inflamatorio; cáncer suprarrenal tal como, pero sin limitar a, feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer de tiroides tal como, pero sin limitar a, cáncer de tiroides papilar o folicular, cáncer de tiroides medular y cáncer de tiroides anaplásico; cáncer de páncreas tales como, pero sin limitar a, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina, y tumor carcinoide o de células de los islotes; cánceres hipofisarios tales como, pero sin limitar a, la enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insipio; cánceres oculares tales como, pero sin limitar a, melanoma ocular, como melanoma de iris, melanoma coroideo y melanoma del cuerpo ciliar y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como el carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar como el carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cáncer cervicales tales como, pero sin limitar a, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como, pero sin limitar a, carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como, pero sin limitar a, carcinoma epitelial de ovario, tumor límite, tumor de células germinales, y tumor estromal; cánceres esofágicos como, pero sin limitar a, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células de avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como, pero sin limitar a, adenocarcinoma, hongo (polipoide), ulcerante, dispersión superficial, dispersión difusa, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como, pero sin limitar a, carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma; cánceres de vesícula biliar como el adenocarcinoma; colangiocarcinomas tales como, pero sin limitar a, papilar, nodular, y difuso; cánceres de pulmón, tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas y (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer de pulmón de células pequeñas; cánceres testiculares tales como, pero sin limitar a, tumor germinal, seminoma, anaplásico, clásico (típico), espermatocito, no seminoma, carcinoma embrionario, carcinoma de teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como, pero sin limitar a, neoplasia intraepitelial prostática, adenocarcinoma, leiomiomas y rhabdomyosarcoma; cánceres penales; cánceres orales tales como, pero sin limitar a, carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales tales como, pero sin limitar a, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoide cístico; cánceres de faringe tales como, pero sin limitar a, cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres de piel tales como, pero sin limitar a, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de dispersión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno letingo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como, pero sin limitar a, carcinoma de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células de transición (pelvis renal y/o útero); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como, pero sin limitar a, carcinoma de células de transición, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, sarcoma endotelio, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial,

cistoadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándula sebácea, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares.

5 Cuando se utiliza con respecto al bloqueo del crecimiento de células madre cancerosas, la expresión "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de anticuerpo anti-GPR49 suficiente para reducir el crecimiento de las células madre cancerosas en cualquier grado. Cualquier ensayo conocido en la materia se puede utilizar para medir el crecimiento de células madre cancerosas. Por ejemplo, el crecimiento de células madre cancerosas puede medirse mediante el recuento de colonias, el recuento total de células o el volumen/tamaño de una población o colonia de células. En varias realizaciones, el crecimiento de células madre cancerosas se puede medir mediante el ensayo de crecimiento de esferas tumorales descrito a continuación en los ejemplos.

10 En determinadas realizaciones, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 puede bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, medida en al menos un 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de reducción en la población de células madre cancerosas o el crecimiento de esferas tumorales, o cualquier porcentaje entre cualquiera de los números mencionados anteriormente. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-GPR49 es uno cualquiera o una combinación de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

20 Por ejemplo, en algunas realizaciones, una cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 puede bloquear el crecimiento de las células madre cancerosas medida mediante al menos aproximadamente un 5 %-99 %, un 5 %-80 %, un 5 a 40 %, un 10 % a 99 %, un 10 a 80 %, un 10-60 %, un 10 %-40 %, un 20 a 99 %, un 20 %-80 %, un 20 %-60 %, un 20 %-40 %, un 50 %-98 %, un 50 %-80 %, o un 60 %-99 % de reducción en la población de células madre cancerosas o crecimiento de esferas tumorales. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-GPR49 es uno cualquiera o una combinación de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

30 En otras realizaciones, la cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 puede bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, medida por al menos aproximadamente 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 10, 25, 50, 75, 100, 200, o 1000 veces la reducción en la población de células madre cancerosas o en el crecimiento de esferas tumorales, o cualquier otra reducción entre cualquiera de los números antes mencionados. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-GPR49 es uno cualquiera o una combinación de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

40 En algunas realizaciones, la cantidad eficaz de un anticuerpo anti-GPR49 suficiente para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas en cualquier grado descrito anteriormente está en una concentración de aproximadamente 1 nM, 50 nM, 75 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM, 350 nM, 400 nM, 500 nM, 550 nM, 600 nM, 700 nM, 800 nM, 900 nM, 1 µM, 50 µM, 75 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM, 350 µM, 400 µM, 500 µM, 550 µM, 600 µM, 700 µM, 800 µM, 900 µM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 75 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM, 400 mM, 500 mM, 600 mM, 700 mM, 800 mM, 900 mM, 1000 mM, 1 M, 5 M, 10 M, 15 M, 20 M, 25 M, 30 M, 35 M, 40 M, 45 M, 50 M, 75 M, 100 M, o cualquier número entre cualquiera de dos de las concentraciones mencionadas anteriormente. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-GPR49 es uno cualquiera o una combinación de los anticuerpos anti-GPR49 designados como 2B5.5, 7F8.2, 1B3.5, 9C6.4, 6H5.4, 10A6.7, 10A9.2, 2G8.1, 6C10.5, 6G10.3, 8H8.1, 6B10.2, 3B8.11, 2F12.5, 5G2.11, 1F10.5, 10E1.1, 7C3.4, 2H9.2, 5B12.4, 3G8.1, 5F2.5, 6G10.1, 14H9.1, 12G5.1, 6E10.1, 14F7.1, 4A10.2, 3F11.1, 11F6.1, 5B10.1, 14A8.1, 8E9.1, 9C7.1, 4F6.2, 1B8.1, 18G7.1, 12E3.1, 6H5.1, 2P69.2, 17C9.1, 2H5.1 y 10A9.2 producidos y descritos en los ejemplos a continuación.

### **Ejemplos**

55 Habiendo descrito en general realizaciones dirigidas a anticuerpos contra GPR49, hibridomas u otras líneas celulares que expresan dichos anticuerpos, ácidos nucleicos y vectores que comprenden ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos, y procedimientos para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas con dichos anticuerpos, se puede obtener una comprensión adicional mediante referencia a ciertos ejemplos específicos que se proporcionan solo con fines ilustrativos y no pretenden ser limitantes.

**Ejemplo 1**Desarrollo de un ensayo de esferas tumorales para mantener, propagar y enumerar células madre del cáncer de colon de tumores primarios de colon.

- 5 Se desarrolló un procedimiento *in vitro* para mantener y propagar células madre del cáncer de colon basándose en la observación de que las células madre normales y malignas del tejido neural y mamario se pueden mantener en cultivos de neuroesferas o mamosferas no adherentes. Estos cultivos de esfera se cultivan en condiciones de "células madre cancerosas": placas de fijación ultra-baja para asegurar cultivos no adherentes, sin suero y complementados con factores de crecimiento (es decir, EGF, bFGF) y factores de desdiferenciación, como el factor inhibidor de la leucemia (LIF, de sus siglas en inglés) (Singh y col., Nature 2004; Dontu y col., Genes Dev, 2003; Liu y col., Can Res 2006). Neuro y mamosferas tienen características de células madre tales como la capacidad de auto-renovación y diferenciación. Los cultivos de esfera establecidos a partir de tejido tumoral maligno, denominados esferas tumorales, son altamente tumorigénicos *in vivo*, además de tener capacidad de auto-renovación y diferenciación. Las esferas tumorales también tienen una mayor resistencia a los reactivos quimioterapéuticos, lo que indica que son un modelo relevante para el desarrollo de fármacos contra el cáncer (Bao, 2006; Dean, 2005; Diehn, Clarke 2006; Elyer, Rich 2008; Li 2008). Las células madre del cáncer de colon se pueden mantener y propagar *in vitro* como esferas tumorales de colon primarias establecidas a partir de biopsias de tumores de colon (denominadas tumores primarios de colon). Las esferas tumorales de colon primarias descritas a continuación establecieron con éxito tumores de xenoinjertos en inmunodeficientes con tan solo 10-100 células. En cambio, las líneas de tumor estándar típicas requieren 1e6 o más células para establecer con éxito tumores de xenoinjertos.
- 20 Procedimientos: El ensayo de esferas tumorales y las células madre cancerosas mantenidas en los cultivos de esferas tumorales se utilizaron para diseñar un ensayo para medir el número de CMC basado en el ensayo de médula ósea hematopoyética utilizado para medir las células madre/progenitoras mediante su capacidad para formar colonias en metilcelulosa (Bradley y Metcalf, 1966). En este ensayo, las células tumorales de colon único vivo procedentes de xenoinjertos de tumor de colon primario o de biopsias de pacientes recientes se clasificaron mediante Mo-Flo y se colocaron en placas entre 1-1000 células por pocillo en placas de fijación ultra bajas de 96 pocillos. Se mantuvieron las células en medio CMC durante 3 semanas, con intercambio de medio fresco cada 3-4 días. Después de 3 semanas, se determinó el número de células madre cancerosas presentes en cada pocillo mediante el recuento del número de colonias o esferas tumorales en cada pocillo utilizando un contador de colonias GELCOUNT® y un software (Oxford Optronix).
- 30 Resultados: Se desarrollaron tres modelos de esferas tumorales que utilizan las esferas tumorales primarias de xenoinjerto de colon CT1 y CT3 (29), y la línea tumoral DLD-1 para evaluar la actividad de las células madre anticancerosas (CMC) *in vitro*.

**Ejemplo 2**Selección de Fab humanas específicas para GPR49 humanos de bibliotecas de presentación de fagos

- 35 Se aislaron anticuerpos humanos que reconocen específicamente el dominio extracelular de un receptor GPR49 humano utilizando la tecnología de presentación de fagos.

**Parte I: Selección de presentación de fagos**

- 40 Procedimientos: Se utilizó ectodominio de GPR49-Fc humano recombinante (GPR49-Fc) (SEQ ID NO: 3) para seleccionar una biblioteca de Fab de fagémido previo humana que contenía  $3,5 \times 10^{10}$  clones únicos (Hoet, R. M., y col. NatBiotechnol. 23(3): 344-8 (2005)). Antes de la incubación con la biblioteca de fagos, se capturó un anticuerpo anti-Fc biotinilado en perlas magnéticas, seguido de la captura de la proteína de fusión GPR49-Fc. Se realizaron selecciones como se describe en Hoet y col. Después de 3 rondas de selección, se eliminó la porción del gen III de 479 pb mediante digestión con MluI y se relegó el vector para la expresión de Fab soluble en células TGI.

- 45 Resultados: Se aislaron 61 clones únicos en esta selección. Los clones únicos se purificaron posteriormente y se reconfirmó la unión.

**Parte II: ELISA**

- La unión de las Fab al ectodominio de GPR49-Fc humano recombinante se demostró mediante ELISA. Procedimientos: En resumen, se recubrió la proteína de fusión GPR49-Fc soluble a 2,5 ug/ml en tampón carbonato 0,025 M, pH 9,6 con 50 ul/pocillo en una placa de 96 pocillos (IMMULON2 HB, Dynex Technologies, Inc., n.º de catálogo 3455) y se incubó durante la noche a 4°C. Se lavó la placa con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Irvine Scientific, n.º de catálogo 9240), pH 7,4 más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300 (Skatron Instruments), bloqueada con tampón que contenía leche sin grasa al 1 %, Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 7,4, y luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, se lavó la placa con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Para el ensayo, se incubó a continuación la placa recubierta con GPR49 con el control y los anticuerpos de prueba de concentraciones variadas, se diluyeron en leche desnatada al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS a 50 ul/pocillo. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la placa

se lavó con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Una dilución de 2.000 veces en leche desnatada al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS de Kappa-HRP antihumano de cabra (Southern Biotech n.º catálogo 2060-05) se añadió a 50 ul/pocillo para detectar el Fab unido. Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Se añadió 100 ul/pocillo de solución TMB (KIRKEGAARD & PERRY LABS, INC. Cat: 50-76-00), y la reacción se detuvo con 50 ul/pocillo de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N (LabChem, n.º de catálogo LC25830-1) después de dos minutos. Se midió la absorbancia a 450 nm, fondo 540 nm para TMB utilizando el lector de placas Molecular Devices. Se analizaron los datos utilizando el paquete de software SOFTMAX PRO versión 4.3 LS (Molecular Devices Corp.) (Figura 1).

Resultados: Esto dio lugar a seis Fabs con unión titulable: 71C10, 86C11, 66D05, 76C12, 78F05 y 76B04.

### 10 Parte III: Análisis de FACS

Procedimientos: Los seis Fab de GPR49 se diluyeron 1:20, 1:40 y 1:80 y se probaron para determinar su unión a HEK293E transfectado con HA-GPR49 mediante FACS. Veinticuatro a cuarenta y ocho horas después de la transfección, se recogen las células en suspensión y se incuban en hielo con anticuerpos anti-GPR49 o IgG de control. Se lavaron las células y se detectaron los anticuerpos primarios con anticuerpos secundarios antiratón conjugados a un cromóforo fluorescente. Se clasificaron las células marcadas mediante FACS para identificar anticuerpos anti-GPR49 que reconocen específicamente la expresión de la proteína GPR49 nativa de la superficie celular.

Resultados: Los seis Fab GPR49 positivos de FACS prospectivos mostraron una disminución en la unión a HA-GPR49-HEK293E al aumentar la dilución de Fab y ninguno mostró unión a HEK293E (Figura 2). Las medias geométricas bajas pueden deberse a que los epítomos de Fab no sean muy accesibles, la expresión baja de GPR49 en la superficie celular o las Fab pueden ser de baja afinidad. Pruebas adicionales realizadas por FACS de Fab GPR49 (diluidas 2 veces desde 400 nM hasta cero) en CHO-GPR49 (MTX 50 nM) en comparación con CHO parentales revelaron tres Fab con CE50 < 10 nM aproximado: 76C12, 76B04 y 78F05 (Figuras 3A y 3B). La prueba de las Fab contra las líneas celulares tumorales (SW480, SW620 y HCT116) reveló que solo el Fab 76C12 es capaz de unirse mediante FACS (Figuras 4A, 4B, 5A-C, y 6A-C).

### Parte IV: Análisis Biacore

Procedimientos: Se identificaron tres Fabs particulares (76C12, 78F05 y 76B04) que se unían específicamente al receptor GPR49 humano con menos de 10 nM de afinidad por FACS. Para analizar la cinética de unión, se inmovilizó el anticuerpo Fc anti-IgG humana biotinilado en un chip Biacore SA a un nivel de 2950 RU. Se capturó luego GPR49-Fc a una densidad de ~400 RU en la celda de flujo 2 con la celda de flujo 1 utilizada como referencia. Las Fab purificadas (100, 50, 25 nM en HSP-EP) se inyectaron a 30 µl/min durante 7 minutos con 20 minutos para permitir la disociación. Se analizaron los datos con el software BIAevaluación (v4.1) que asume un modelo 1:1. Para probar la reactividad cruzada de las Fab con el dominio Fc, se capturó luego IgG1 Fc a una densidad de ~250 RU en la celda de flujo 2 con la celda de flujo 1 como referencia. Todas las Fab se probaron en las mismas condiciones que anteriormente. Todos los experimentos de Biacore se realizaron a 25 °C en un instrumento Biacore 3000.

Resultados: las Fab 76C12 y 78F05 se unieron con K<sub>D</sub> de 3,4 nM y 1,7 nM respectivamente. Fab 76B04 exhibió una unión débil.

### Ejemplo 3

#### Construcción de IgG anti-GPR49 de longitud completa

Procedimientos: Tres Fab se convirtieron en IgG1 humana y se expresaron en células CHO. Se seleccionaron las secuencias de ADN que codifican tres Fabs anti-GPR49 diferentes 76C12, 78F05 y 76B04 de una biblioteca de fagos de anticuerpos humanos (Dyax Corp) mediante bioselección contra una proteína de fusión de ectodominio-Fc humana recombinante GPR49. Se utilizaron las secuencias de los genes Fab para construir plásmidos de expresión que codifican anticuerpos de longitud completa utilizando el sistema de vector de expresión pV90AS para la producción de anticuerpos en células de mamíferos. pV90AS es un vector de expresión pV90 modificado diseñado para generar dos transcritos de un solo promotor a través del empalme alternativo de un transcrito primario (Referencia: Solicitud USPTO WO2005/089285). El donante de empalme de CMV natural se empalma a un aceptor de empalme parcialmente dañado para generar un transcrito que codifica la cadena ligera del anticuerpo, o bien a un aceptor de empalme de CMV natural para generar el transcrito que codifica la cadena pesada del anticuerpo. El aceptor de empalme parcialmente deteriorado ha sido diseñado para dar lugar a cantidades similares de transcritos de cadenas tanto pesadas como ligeras. Se amplificaron las regiones variable (VL) y constante (CL) de cadena ligera mediante PCR. El cebador de PCR de la cadena ligera en el 5' incluyó un sitio de endonucleasa de restricción Sfi I seguido de una secuencia que codifica un péptido señal de la cadena ligera de inmunoglobulina MDMRVPAQLLGLLLLWLPGAR (SEQ ID NO: 5) en el marco de las secuencias correspondientes al extremo amino de la región VL de acuerdo con los procedimientos descritos en Nakamura T, y col., Int J Immunopharmacol. 22:131-41 (2000) que se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad. El producto de la PCR se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción mediante el protocolo del kit QIAquick GelExtraction (QIAGEN CA), se digirió con las endonucleasas de restricción Sfi I y Asc I y se ligó con el vector pHLP025 digerido

con Sfi I/Asc I (Holly Prentice). El vector pHLP025 contiene sitios de endonucleasas de restricción Sfi I/Asc I para recibir la cadena ligera del anticuerpo (señal péptido-VL-CL) como un fragmento de PCR digerido por Sfi I/Asc I además de la secuencia natural del sitio donante de empalme de CMV, una secuencia del sitio aceptor del empalme parcialmente dañado y una secuencia señal poli A (Referencia: Solicitud USPTO WO2005/089285).

- 5 La región variable (VH) de la cadena pesada de cada Fab anti-GPR49 (76C12, 78F05, 76B04) se amplificó por PCR. La PCR VH de la cadena pesada en el 5' incluyó un sitio de endonucleasa de restricción Nco I seguido de una secuencia que codifica el péptido señal sintético de la cadena pesada MGWSLILLFLVAVATRVLS (SEQ ID NO: 5) en el marco de las secuencias correspondientes al extremo amino de la región VH como se describió anteriormente. El cebador de PCR VH de la cadena pesada en el 3' incluía una secuencia correspondiente al extremo carboxilo de la región VH y un sitio SfiI. El producto de la PCR se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción mediante el protocolo del kit QIAquick GelExtraction (QIAGEN, CA), se digirió con las endonucleasas de restricción Nco I y Sfi I y se ligó con el vector pHLP029 digerido con Nco I/Sfi I (Holly Prentice). El vector pHLP029 contiene sitios Nco I/Sfi I para recibir la secuencia de péptido señal-VH del anticuerpo como un fragmento de PCR digerido por Nco I/Sfi I además de una secuencia señal poli A cadena arriba, una secuencia natural de sitio aceptor de empalme de CMV y una secuencia señal poli A cadena abajo (Referencia: Solicitud USPTO WO2005/089285).

Las secuencias de genes que codifican para (sitio Sfi I péptido señal de cadena ligera anti-GPR49 VL y CL) en pHLP025 y (péptido señal de cadena pesada anti-GPR49 del sitio VH-Sfi I) en pHLP029 se ensamblaron en un único fragmento de ADN mediante amplificación por PCR a través de secuencias comunes superpuestas presentes en ambos vectores utilizando los cebadores de PCR VH de cadena ligera en el 5' y cadena pesada en el 3' descritos anteriormente. El producto resultante de PCR se purificó mediante electroforesis en gel de agarosa y extracción mediante el protocolo del kit QIAquick GelExtraction (QIAGEN, CA), se digirió con endonucleasa de restricción Sfi I y se ligó con el vector parental IgG1 digerido con Dra III.

Resultados: El plásmido resultante produce un transcrito de precursor bicistrónico que, tras un empalme alternativo, produce ARNm de cadena pesada y ligera de anticuerpos traduccionalmente activos en cantidades aproximadamente estequiométricas. Las secuencias correctas fueron confirmadas por análisis de secuencia de ADN. La expresión de longitud completa en células de mamíferos dio como resultado la producción de anticuerpos IgG1 humanos estables.

#### **Ejemplo 4**

##### Construcción de IgG anti-GPR49 de longitud completa para la expresión mejorada en células de mamíferos

- 30 Para mejorar los rendimientos de expresión de anticuerpos y la calidad del producto, se modificaron las secuencias originales del gen VH de las Fab 76C12, 78F05, 76B04 anti-GPR49.

Procedimientos: En primer lugar, las secuencias VH anti-GPR49 se analizaron para detectar secuencias que contienen sitios de empalme putativos con programas públicos de reconocimiento de secuencias ([www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene\\_spl.html](http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html) (The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Center Drive, Rockville, Md. 20850), [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)). (Martin G. Reese y Frank H. Eeckman, Lawrence Berkeley National Laboratory, Genome Informatics Group, 1 Cyclotron Road, Berkeley, Calif, 94720; véase también, Reese M G, Eeckman, F H, Kulp, D, Haussler, D, 1997. "Improved Splice Site Detection in Genie". J Comp Biol 4(3), 311-23.). En segundo lugar, los codones en la región variable de cadena pesada de las Fab anti-GPR49 se reemplazaron con los codones correspondientes a las posiciones de Kabat idénticas de los anticuerpos que se han expresado con éxito en células CHO sin encontrar ningún cambio en la secuencia del polipéptido VH anti-GPR49 original. Este segundo paso elimina principalmente los sitios de empalme putativos, pero se realizó un análisis de sitio de empalme adicional seguido de un intercambio de codones sinónimos para reducir la probabilidad pronosticada de que un sitio de empalme putativo esté presente.

Los fragmentos de ADN que codifican el líder sintético de cadena pesada en el marco con secuencias VH optimizadas de secuencia de Fabs anti-GPR49 se obtuvieron como secuencias de ADN de doble cadena sintetizadas químicamente de un proveedor comercial (Blue Heron Biotechnology, Inc. Bothell Wash.). Los sitios de endonucleasas de restricción Nco I y Sfi I en el 5' y 3' se incluyeron en los fragmentos sintetizados. Los fragmentos de la región VH líder y de secuencia optimizada anti-GPR49 se clonaron en el vector pHLP029 digerido con Nco I/Sfi I como se describe en el ejemplo 3 anterior. La recombinación con las correspondientes cadenas ligeras apropiadas en pHLP025 y la posterior clonación del fragmento único es como se describe en el ejemplo 3 anterior. Las secuencias correctas fueron confirmadas por análisis de secuencia de ADN.

Resultados: La expresión de anticuerpos de longitud completa de esta serie de plásmidos en células de mamíferos da como resultado un aumento de la producción de anticuerpos IgG1 humanos estables.

#### **Ejemplo 5**

- 55 Expresión transitoria y caracterización de los anticuerpos GPR49

Procedimientos: Se utilizaron ADN plasmídicos para transformar células CHO DG44 para la producción transitoria de

5 proteína de anticuerpo. Se combinaron 20 ug de ADN plasmídico con 4x10<sup>6</sup> células en un volumen de 0,4 ml de PBS 1x. Se añadió la mezcla a una cubeta de 0,4 cm (BioRad) y se colocó en hielo durante 15 min. Las células se sometieron a electroporación a 600 uF y 350 voltios con un electroporador Gene Pulser (BioRad). Se colocaron las células en un matraz T-25 que contenía medios CHO-SSFM II más hipoxantina 100 uM y timidina 16 uM y se incubaron a 37 °C durante 4 días. Además, también se utilizó ADN plasmídico para transfectar células 293E para la expresión transitoria de la proteína del anticuerpo. Se transfectaron 1,2 u.g de cada ADN plasmídico (pesado y ligero) en 2x10<sup>6</sup> células con el protocolo de transfección de efecto de Qiagen (Qiagen, CA). Se incubaron las células a 37 °C durante 3 minutos.

10 Resultados: Se recogió el sobrenadante y se confirmó el anticuerpo de longitud completa mediante los procedimientos de transferencia de Western y ELISA. La capacidad de la IgG1 completa para unirse a GPR49 se confirmó mediante ELISA.

### Ejemplo 6

#### Desarrollo de la línea celular CHO productora de anticuerpos anti-GPR49

15 Este ejemplo proporciona una descripción detallada de la expresión del anticuerpo anti-GPR49 que comprende el dominio de unión de la Fab 76C12 como IgG1 de longitud completa. Los otros Fab descritos en el presente documento, es decir, los enumerados en el ejemplo 2, se expresaron de manera similar.

20 Procedimientos: Las regiones variables y constantes de 76C12 son de origen de secuencia humana. Todas las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada proceden de un Fab generado contra GPR49 humano mediante la tecnología de presentación de fagos DYAX. La variable, así como las regiones constantes de la cadena ligera se subclonaron en un vector de expresión de empalme alternativo. La configuración de empalme alternativa une la cadena ligera y pesada a través de la utilización de un solo donante de empalme con dos aceptores de empalme en el que cada aceptor de empalme genera un transcrito que codifica una de las dos cadenas. El ADN del vector de expresión que codifica los genes de inmunoglobulina se electroporó en células de ovario de hámster chino independientes de la insulina (CHO DG44i). Se seleccionó un transfectoma de CHO para fines de producción.

25 Se clonó el ADN complementario de los dominios variable (VL) y constante (CL) correspondientes del gen de la cadena ligera de 76C12 y el dominio variable (VH) del gen de la cadena pesada de 76C12 en un vector de expresión. El vector contiene sitios de clonación para insertar la cadena ligera completa y los ADNc pesados variables directamente cadena arriba de la región constante de la cadena pesada humana. Además de los genes de Ig, este vector de expresión contiene un gen de dihidrofolato reductasa (DHFR) que se puede utilizar para la selección en células de mamíferos. El vector de expresión resultante se transfectó luego en células CHO para iniciar la generación de las líneas celulares CHO secretoras anti-GPR49.

30 El vector de expresión se electroporó en células CHO. Se utilizaron cebadores de PCR específicos de la cadena ligera de inmunoglobulina para amplificar por PCR el ADNc de la cadena ligera de Fab. La secuencia oligo específica en el 5' incluía el péptido señal nativo de la cadena ligera de la molécula anti-CD23 Biogen Idec. Los oligos en el 5' y 3' contienen secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción Sfi I y Asc I, respectivamente, para subclonar en un vector intermedio. El ADNc de VH se amplificó por PCR utilizando un oligo en el 5' que incluía un péptido señal sintético de cadena pesada. Los oligos en el 5' y 3' contienen secuencias de reconocimiento de endonucleasas de restricción Nco I y Sfi I, respectivamente, para subclonar en un vector intermedio.

35 Se utilizó PCR superpuesta que utiliza los oligos de la cadena ligera en el 5' y VH en el 3' como plantillas para combinar la cadena ligera y la región VH como un segmento de ADNc. El producto resultante se subclonó en el sitio Dra III, creando así el vector de expresión de empalme alternativo final. La configuración de empalme alternativo genera dos transcritos de un solo promotor a través del empalme alternativo de la transcripción primaria. El donante de empalme de CMV natural se empalma a un aceptor de empalme subóptimo para generar un transcrito que codifica la cadena ligera, o bien a un aceptor de empalme de CMV natural para generar el transcrito que codifica la cadena pesada. El aceptor de empalme subóptimo ha sido diseñado para generar cantidades similares de ambos transcritos.

40 Se preparó el vector de ADN final en tampón HEBS a una concentración de 700 ng/ul antes de la electroporación en células CHO. Se realizaron cinco electroporaciones utilizando diversas concentraciones de ADN (15, 20, 30, 40 y 45 ug). Cada electroporación se realizó en una cubeta desechable de 0,4 cm (Invitrogen) que contenía 4x10<sup>6</sup> células CHO en fase logarítmica en 0,7 ml de tampón HEBS estéril y ADN en 0,1 ml de HEBS (0,8 ml de volumen total). Se sometieron las células a un shock utilizando un Bio-Rad Gene Pulser XCELL, fijado a 290 voltios, 950 microfaradays. Luego, se dejaron reposar las células en shock a temperatura ambiente durante 10 minutos, luego se mezclaron con 10 ml de medio CHOM16 libre de insulina a temperatura ambiente, se centrifugaron (3' a 1000 rpm) y se aspiraron.

45 Luego, se resuspendieron las células en 12 ml de medio CHOM16 libre de insulina (RT) y se transfirieron a un matraz de cultivo de tejidos T-75.

Células y medios: antes de la electroporación, se cultivaron las células CHO en medios sin suero (CHOM24) con la adición de 1x nucleósidos. CHOM24 es una formulación interna de medios químicamente definida que no contiene

ningún componente animal. La selección del metotrexato se realizó en medios químicamente definidos CHOM16 y CHOM24 libres de nucleósidos.

5 Después de la electroporación, se reunieron 4x10<sup>6</sup> células CHO en un matraz T-75. La selección para la expresión de DHFR comenzó inmediatamente cuando se inocularon las células en medio libre de nucleósidos. Finalmente se expandieron las células a matraces de agitación de 125 ml en CHOM24 (~ 3 semanas). Para aislar líneas celulares clonales, las agrupaciones estables transfectadas se diluyeron y se colocaron en placas de 1 célula/pocillo en 200 uL de CHOM16 en cuatro placas de 96 pocillos. Las placas se mantuvieron a 37 °C hasta que se seleccionaron para determinar el título de anticuerpos.

10 Se seleccionaron las colonias de CHO para determinar la producción de inmunoglobulina mediante el análisis de los sobrenadantes celulares utilizando un ELISA específico para la cadena kappa humana (del día 21 al día 28 después de la siembra). El anticuerpo de captura utilizado en el ELISA fue una antiIgG humana de cabra policlonal (SouthernBiotech) y el anticuerpo de detección fue una antikappa humana de cabra policlonal conjugada con peroxidasa de rábano picante (SouthernBiotech). Se expandieron las colonias que secretaban la mayor cantidad de inmunoglobulina.

15 Resultados: Se desarrollaron líneas celulares CHO de alta expresión que dieron como resultado Abm anti-GPR49 con las propiedades bioquímicas y biofísicas esperadas adecuadas para la ampliación y la fabricación.

### Ejemplo 7

#### Purificación y caracterización de anticuerpos IgG1 anti-GPR49 completamente humanos

20 El anticuerpo producido en las células CHO se purificó y caracterizó mediante los procedimientos que se describen a continuación.

25 Procedimientos: Captura de proteína A: Se equilibró previamente una columna de proteína A con PBS 1x (tampón de equilibrio) a 100-150 cm/h con 3 volúmenes de columna. Se cargó el sobrenadante a 150 cm/h con un máximo de 10 mg de Abm GPR49 por mililitro de resina. Después de cargar, se lavó la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrio. Después, se eluyó la columna por etapas en una dirección de flujo ascendente con glicina 100 mM, pH 3,0. Se recogieron las fracciones deseadas y se titularon a pH neutro con Tris base 2M. Se dializaron las fracciones recogidas frente a PBS 1x y se concentró el material para preparar la etapa de exclusión de tamaño. Una etapa de eliminación de agregado de la exclusión por tamaño incluyó el equilibrio de SUPERDEX 200 con PBS 1x con 1,5 volúmenes de columna a un caudal de 36 cm/h seguido de la carga de proteínas y la recolección de las fracciones deseadas.

30 La prueba de identidad se realizó de la siguiente manera:

35 1) Análisis de masas intactas mediante espectrometría de masas en el que las mediciones de masa molecular se realizaron en un espectrómetro de masas de electroaspersión (ESI-MSD). Antes del análisis, se redujo la muestra para eliminar los enlaces disulfuro. El espectro de masas deconvolucionado representa las masas de las cadenas pesada y ligera.

2) Se realizó el análisis de la secuencia N-terminal mediante la degradación de Edman utilizando un secuenciador de proteínas ABI equipado con un analizador de PTH en línea. Se identificaron las secuencias para los aminoácidos iniciales de la cadena ligera y la cadena pesada.

40 3) Mapeo de péptidos con análisis espectrométrico de masas: se realizaron mapas de péptidos trípticos y/o EndoLysC para obtener una cobertura completa de la secuencia mediante el análisis de los datos de LC/MS generados a partir de cada péptido. Además, se detectó la determinación de sitios y cantidades de oxidación y desamidación.

45 La prueba de pureza fue realizada por: 1) SDS-Page o CE-SDS: muestras reducidas y no reducidas, esta técnica se utiliza para medir la fragmentación, agregación e impurezas de los anticuerpos, 2) se utilizó la técnica SEQ-HPLC con LS y RI para medir la agregación y la fragmentación y, la dispersión de la luz determina la masa molar de los componentes de la muestra. 3) Se utilizó el procedimiento SDS en gel o IEF capilar para determinar el patrón de enfoque isoelectrónico y la distribución pi de las isoformas de carga que pueden resultar de la heterogeneidad y/o desamidación del extremo C y N. Finalmente, se midieron las concentraciones de endotoxinas mediante el procedimiento turbidométrico cinético del lisado de amebocitos de Limulus (LAL).

50 Resultados: La purificación de Abm anti-GPR49 dio como resultado más del 99 % de monómeros, Abm libres de endotoxinas en cantidades en gramos con propiedades adecuadas para la ampliación y la fabricación.

### Ejemplo 8

#### Producción de anticuerpos de ratón contra ectodominio humano GPR49

##### **Parte I: Selección de hibridomas**

Procedimientos: Para producir anticuerpos contra el ectodominio de GPR49, se inmunizaron ratones tres veces con

5 GPR49-His purificado y sin endotoxinas (SEQ ID NO: 4) utilizando técnicas estándar. Se examinó la sangre de ratones individuales para el reconocimiento de antígenos utilizando análisis ELISA y FACS. Los animales con los títulos de anticuerpos más altos se seleccionaron para el refuerzo de antígeno final, después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridomas. Aproximadamente se transfirieron 1.000 clones de placas de fusión de 4x24 pocillos a placas de cultivo de 10x96 pocillos. Se seleccionaron 199 clones positivos mediante ELISA de captura GPR49-Fc y se transfirieron a placas de 48 pocillos. De estos, no se seleccionaron 100 clones positivos porque mostraron una unión positiva o negativa a GPR49-CHO con CHO parental mediante FACS. Se seleccionaron, luego, 50 de los 99 clones positivos dependiendo del isotipo.

10 Resultados: Se subclonaron 36 clones (bandas de IgG simples o mixtas, tales como, IgG1/k, IgG2a/G e IgG1/2b/k). 8 clones perdieron la expresión de los parentales a los subclones. Los anticuerpos monoclonales (Abm) de 24 subclones seleccionados se purificaron a partir del sobrenadante del hibridoma utilizando cromatografía en agarosa de proteína A o proteína G y los anticuerpos se analizaron por FACS como se describe a continuación.

**Parte II: Análisis de FACS**

15 Procedimientos: Se diluyeron en serie los 24 Abm GPR49 murinos y se analizaron para determinar su unión a CHO transfectadas con GPR49-Flag-His y CHO parental mediante FACS (procedimientos estándar).

Resultados: Los resultados se resumen en la tabla 2 (datos mostrados en las figuras 7A-C)

**Tabla 2**

Abm GPR49 ms	CE50 de FAC (nM)
2B5.5	~ 0,2
7F8.2	~ 0,2
1B3.5	0,8129
9C6.4	0,8297
6H5.4	~ 1
10A6.7	1,428
10A9.2	4,522
2G8.1	9,766
6C10.5	9,978
6G10.3	~ 10
8H8.1	11,19
6B10.2	11,2
3B8.11	12,14
2F12.5	14,64
5G2.11	20,94
1F10.5	24,54
10E1.1	29,49
7C3.4	34,51
2H9.2	43,27
5B12.4	43,56
3G8.1	63,83
5F2.5	530,5
6G10.1	2658

**Parte III: Análisis Biacore**

20 Las cinéticas de unión de los Abm de ratón se analizaron por Biacore.

25 Procedimientos: Se inmovilizó el anticuerpo Fc anti-IgG humana biotinilado en un chip Biacore SA a un nivel de 2950 RU. Se capturó luego GPR49-Fc a una densidad de ~ 400 RU en la celda de flujo 2 con la celda de flujo 1 utilizada como referencia. Los Abm murinos purificados (100, 50, 25 nM en HSP-EP) se inyectaron a 30 µl/min durante 7 minutos con 20 minutos para permitir la disociación. Se analizaron los datos con el software BIAevaluación (v4.1) que asume un modelo 1:1. Todos los experimentos de Biacore se realizaron a 25 °C en un instrumento BIAcore 3000.



Resultados: Los Abm murinos se unieron a GPR49-Fc con afinidades de 64 nM a menos de 1 nM ( $K_D$ ). Los datos se muestran en la tabla 3.

**Tabla 3**

	<b>BIAcore</b>
<b>Abm</b>	<b><math>K_D</math> nM</b>
1B3-5	1,11
5B12.4	7,52
6C10.5	0,68
9C6.4	1,44
5G2.11	1,59
6G10_3	2,72
10E1_1	3,98
7F8.2	0,91
10A9.2	< 100 pM
6B10_2	3,05
2H9-2	0,71
2G8.1	ND
6H5.4	0,17
10A6_7	< 100 pM
3B8-11	3,92 $\mu$ M
3G8.1	0,99
7C3_4	6,32
2B5-5	1,67
8H8_1	1,54
2F12.5	1,29
1F10.5	64,0
5F2_5	5,52
6G10.1	0,14

**Ejemplo 9**

5 Producción de anticuerpos de ratón para GPR49 humano de longitud completa

**Parte I: Selección de hibridomas**

Procedimientos: Para producir anticuerpos contra el receptor de longitud completa, se inmunizaron ratones tres veces con 10  $\mu$ g/ratón de vector de ADN que codifica el clon de ADNc de longitud completa del gen GPR49 mezclado con partículas de oro. Se examinó la sangre de ratones individuales aproximadamente 75 días después de la inmunización inicial para el reconocimiento de antígenos utilizando análisis ELISA y FACS. Los animales con los títulos de anticuerpos más altos se seleccionaron para el refuerzo de antígeno final (25  $\mu$ g de GPR49-Fc, 10  $\mu$ g de GPR49-DNA/partícula de oro y  $5 \times 10^6$  células GPR49-CHO) después de lo cual se aislaron células de bazo para la producción de hibridomas. Se generaron aproximadamente 10.000 clones con aproximadamente 200 clones positivos por ELISA de captura GPR49-CHO.

15 Resultados: Se confirmaron 67 clones por ELISA y GPR49-CHO FACS. Luego, se subclonaron 22 de los clones positivos (bandas de IgG simples o mixtas, tales como, IgG1/k, IgG2a/G e IgG1/2b/k). Los anticuerpos monoclonales (Abm) de 19 subclones seleccionados se purificaron a partir del sobrenadante del hibridoma utilizando cromatografía en agarosa de proteína A o proteína G y los anticuerpos se analizaron por FACS como se describe a continuación.

**Parte II: Análisis de FACS**

20 Procedimientos: Se diluyeron en serie los 19 Abm GPR49 murinos y se analizaron para determinar su unión a CHO transfectadas con GPR49-Flag-His y CHO parental mediante FACS (procedimientos estándar).

Resultados: Los Abm murinos se unieron a GPR49 con de 17 nM a menos de 1 nM ( $EC_{50}$ ). Los resultados se resumen en la tabla 4 (datos mostrados en las figuras 8A-D). El anticuerpo 10A9.1 se utilizó como control.

Tabla 4

Abm	EC50 (nM, CHO-GPR49)
14H9.1	0,9
12G5.1	1,2
6E10.1	1,3
14F7.1	1,5
4A10.2	1,7
3F11.1	1,8
11F6.1	1,9
5B10.1	1,9
14A8.1	2,1
8E9.1	2,2
9C7.1	2,2
4F6.2	2,2
1B8.1	2,2
18G7.1	2,5
12E3.1	2,6
6H5.1	3,0
2P69.2	5,1
17C9.1	12,5
2H5.1	17,5
10A9.2	(1º Abm de gen) 6,2

### Parte III: ELISA de unión directa a GPR49

Para caracterizar la unión de los anticuerpos de ratón a GPR49, se realizó un ensayo ELISA de unión directa.

5 Procedimientos: La proteína de fusión GPR49-Fc soluble a 2,5 ug/ml en tampón carbonato 0,025 M, pH 9,6 se recubrió a 50 ul/pocillo en una placa de 96 pocillos (IMMULON2 HB, Dynex Technologies, Inc., n.º de catálogo 3455) se colocó en placa y se incubó durante la noche a 4 °C. La placa se lavó con solución salina tamponada con fosfato (PBS, Irvine Scientific, n.º de catálogo 9240), pH 7,4 más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300 (Skatron Instruments), bloqueada con tampón que contenía leche sin grasa al 1 %, Tween 20 al 0,05% en PBS, pH 10 7,4, y luego se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la incubación, la placa se lavó con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Para el ensayo, se incubó a continuación la placa recubierta con GPR49 con el control y los anticuerpos de prueba de concentraciones variadas, se diluyeron en leche desnatada al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS a 50 ul/pocillo. Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, la placa se lavó con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Una dilución de 2.000 veces en leche desnatada al 1 %, Tween 20 al 0,05 % en PBS de Fc-HRP antiratón de cabra (Southern Biotech Cat n.º 2060-05) se 15 añadió a 50 ul/pocillo para detectar el Fab unido. Se incubó la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavó con PBS más Tween 20 al 0,025 % en la lavadora Skan 300. Se añadió 100 ul/pocillo de solución TMB (KIRKEGAARD & PERRY LABS, INC. Cat: 50-76-00), y la reacción se detuvo con 50 ul/pocillo de H2SO4 4N (LabChem, n.º de catálogo LC25830-1) después de dos minutos. Se midió la absorbancia a 450 nm, fondo 540 nm para TMB utilizando el lector de placas Molecular Devices. Se analizaron los datos utilizando el paquete de software 20 SOFTMAX PRO versión 4.3 LS (Molecular Devices Corp.). Los valores de EC50 se obtuvieron como resultado.

Resultados: Los Abm murinos se unieron a GPR49-Fc con EC50 en el intervalo de 224 nM a menos de 1 nM (Tabla 5; figuras 9A-D).

Tabla 5

EC50 (ELISA) [nM]	Hibridoma
0,2	8E9.1
0,24	11F6.1
0,25	12G5.1
0,27	5B10.1
0,28	6H5.1
0,38	14A8.1
0,5	9C7.1
0,53	4A10.2
0,55	14H9.1
0,55	14E3.1
0,57	14F7.1
0,65	4F6.2
0,657	6E10.1
0,67	2P69.2
0,88	3F11.1
0,95	17C9.1
1,34	1B8.1
1,35	18G7.1
2,86	2H5.1
225,4	18D9.1

**Ejemplo 10**

Los tumores de cáncer se pueden clasificar con anticuerpos anti-GPR49

5 Procedimientos: Se midió la expresión de GPR49 en colon y otras células tumorales mediante citometría de flujo (FAC) utilizando los Abm 76C12 y 78F05 anti-GPR49.

10 Resultados: Se encontró que GPR49 se expresaba en múltiples tumores de colon (CT1, CT3, LS174T, Sw480, HCT116, SW620, DLD-1, Lovo), tumor gástrico N87, tumor de pulmón A549 y transfectantes estables de control positivo GPR49-CHO. Además, se confirmó la especificidad de la unión de Abm anti-GPR49 a GPR49 mediante la eliminación de ARNi de GPR49 en células LS174T, lo que inhibió significativamente la unión de los Abm 76C12, 76B04, 78F05 de GPR49 para unir células LS174T.

**Ejemplo 11**

Validación de GPR49 como marcador de células madre de cáncer de colon (CMC)

El ensayo de esferas tumorales de colon descrito en el ejemplo 1 se utilizó para determinar si las células tumorales de colon aisladas en base a la unión de Abm anti-GPR49 estaban enriquecidas para células madre cancerosas.

15 **Parte I:**

20 Procedimientos: Las células del tumor de colon primario CT1 mantenidas en las condiciones de esferas tumorales de las células madre cancerosas se clasificaron por FAC utilizando Abm 76C12 de GPR49. Se sembraron células positivas a GPR49 (GPR49+), negativas a GPR49 (GPR49-) y negativas no vivas a PI (yoduro de propidio) a 1 célula por pocillo en placas de 96 pocillos, y se analizaron 3 semanas después para determinar la capacidad de formación de esferas (es decir, número de células madre cancerosas).

Resultados: Las células tumorales de colon GPR49 positivas (GPR49+) clasificadas estaban altamente enriquecidas para la actividad de las células madre cancerosas en comparación con las células negativas y sin clasificar GPR49 (Figuras 10A y 10B). Las células tumorales de colon LS174T clasificadas en GPR49 estaban altamente enriquecidas de manera similar para las células madre cancerosas en 2 experimentos independientes separados.

25 **Parte II:**

Procedimientos: Para corroborar más estos resultados, se realizó un experimento adicional en el que las esferas tumorales de células madre del cáncer de colon se trataron con GPR49 o control ARNi-1 y luego se sembraron en placas de 96 pocillos a 250 células por pocillo.

Resultados: El tratamiento con GPR49 RNAi-1 pero no con control ARNi redujo significativamente el número de células madre de cáncer de colon medido 14 días después del tratamiento.

### Ejemplo 12

Las células tumorales de colon positivas para GPR49 tienen propiedades de células madre cancerosas *in vivo*

- 5 Procedimientos: Para mostrar que las células GPR49+ aisladas tienen propiedades de células madre cancerosas, se realizaron ensayos *in vivo* de células madre cancerosas que comparan el crecimiento *in vivo* de células GPR49+ frente a GPR49-. Las células GPR49+ de la línea del tumor primario del colon CT1 se clasificaron con 76C12 utilizando un MoFlo, y se implantaron a 1000 células por ratón. Se analizaron los ratones para determinar la formación de tumores y la pérdida de peso durante los siguientes 50 días.
- 10 Resultados: Las células tumorales de colon primarias GPR49+ causan un crecimiento agresivo del tumor (Figura 11A) y una rápida pérdida de peso (Figura 11B) en un estudio de xenoinjerto de tumor primario. En cambio, las células GPR49- crecieron muy lentamente y no causaron una pérdida rápida de peso. Estos hallazgos demuestran que las células tumorales de colon de alta expresión de GPR49 son altamente tumorigénicas, una característica importante de las células madre cancerosas.

### 15 Ejemplo 13

Las R-espondinas se unen a GPR49 con alta afinidad pero no activan la señalización mediada por GPR49

- Parte I: GPR49 es un receptor acoplado a la proteína G huérfana (GPCR, de sus siglas en inglés) relacionado con la familia del receptor de la hormona glicoproteica (por ejemplo, receptores para FSH, TSH, LH) y es un marcador de células madre intestinales y estomacales que se identificó mediante la selección de los genes diana de Wnt en el intestino (Barker y col., Nature, 2007). Para identificar el ligando natural de GPR49, los estudios de unión se centraron en los moduladores conocidos de la ruta Wnt Noggin, Gremlin1, DAN, de tipo cordina 1, Cerberus1, PRDC, stanniocalcin-1, COCO, Cordina, R-espondina-3, BMP2 y BMP4.
- 20 Procedimientos: Se determinó la actividad de unión del ligando a GPR49-Fc en un ensayo basado en interferometría de biocapa. En resumen, todos los ligandos de prueba y GPR49-Fc (todos comprados de los sistemas de R&D) se diluyeron en tampón OB (PBS, pH 7,4, Na<sub>3</sub>N al 0,01 % (p/v), BSA 1 mg/ml, Tween 20 al 0,02 % (v/v)). GPR49-Fc fue capturado en puntas Octet de antiIgG humana (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA; Parte nº 18-5001), utilizando un sistema Octet Red (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA). Se lavaron las puntas en tampón OB y se trasladaron a pocillos que contenían el ligando de prueba en tampón OB. La unión del ligando de prueba a GPR49-Fc se registró como señales de biointerferometría durante una fase de asociación (120 segundos) y una fase de disociación (120 segundos). Además, se probaron los ligandos contra GPR49-Fc murino.
- 30 Resultados: Los miembros de la familia R-espondina (RSPO) interactúan con el GPR49-Fc humano, pero muestran un componente no específico que dificulta la interpretación. Específicamente, las dos fases de asociación y disociación observadas sugieren múltiples eventos de unión. Los miembros de la familia RSPO no interactúan con el GPR49-Fc de ratón [88 % de identidad (91 % similar)].

- Parte II: Aunque el GPR49-Fc utilizado es un dímero del ectodominio GPR49 en solución (debido a las mitades Fc que interactúan), la unión bifásica no puede explicarse por esto debido a la inmovilización del GPR49-Fc en la punta y el estado monomérico de las moléculas RSPO de prueba. Por lo tanto, la naturaleza bifásica de la unión de RSPO a GPR49-Fc se investigó adicionalmente mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie de afinidad en solución.
- 35 Procedimientos: Se analizó la unión de RSPO a GPR49 utilizando resonancia de plasmón de superficie de afinidad de solución (Day ES, y col. Biochemistry. 2005 Feb 15;44(6): 1919-31.). El procedimiento utiliza condiciones de la llamada unión "limitada por transporte de masa", en el que la tasa inicial de unión del ligando (proteína que se une al chip sensor) es proporcional a la concentración de ligando en la solución (BIAApplications Handbook (1994) Capítulo 6: Concentration measurement, págs 6-1-6-10, Pharmacia Biosensor AB). En estas condiciones, la unión del analito soluble (proteína que fluye sobre la superficie del chip) a la proteína inmovilizada en el chip es rápida en comparación con la difusión del analito en la matriz de dextrano sobre la superficie del chip. Por lo tanto, las propiedades de difusión del analito y la concentración de analito en la solución que fluye sobre la superficie del chip determinan la tasa a la que el analito se une al chip. En este experimento, la concentración de RSPO-1 libre en solución se determina mediante la tasa inicial de unión a un chip Biacore CM5 que contiene GPR49-Fc inmovilizado.
- 40 En estas soluciones de RSPO-1 se valoraron las GPR49-Fc competidoras.

- Resultados: Las tasas de unión iniciales se obtuvieron a partir de los datos en bruto de sensorgrama. R-espondina-1 mostró un perfil de unión bifásico que sugiere múltiples sitios de unión cooperativa para RSPO en GPR49.

- Parte III. Para probar los efectos de la RSPO en la señalización GPR49, se utilizaron múltiples ensayos.

- Procedimientos: Los ensayos de AMP cíclico, flujo de calcio y  $\beta$ -arrestina se realizaron mediante procedimientos

Resultados: Las tasas de unión iniciales se obtuvieron a partir de los datos en bruto de sensorgrama. R-espondina-1 mostró un perfil de unión bifásico que sugiere múltiples sitios de unión cooperativa para RSPO en GPR49.

Parte III. Para probar los efectos de la RSPO en la señalización GPR49, se utilizaron múltiples ensayos.

Procedimientos: Los ensayos de AMP cíclico, flujo de calcio y  $\beta$ -arrestina se realizaron mediante procedimientos

estándar. Además, un ensayo indicador de  $\beta$ -catenina/TCF que es un ensayo indicador basado en la transcripción que caracteriza la vía de señalización Wnt/beta-catenina. El ensayo indicador de  $\beta$ -catenina/TCF utilizó células transfectadas con el indicador de SABioscience TCF/IEF o constructo negativo. Después de 24 horas de transfección, se contaron las células y se dividieron en alícuotas ( $2 \times 10^4$  células/pocillo) en una placa de 96 pocillos. Las células se privaron de alimento con Opti-MEM + FBS al 0,5 % + NEAA 0,1 mM + piruvato de sodio 1 mM + 1x medio antibiótico durante 6 horas. Se trataron las células con una cantidad titulada de RSPO y mWnt3a (200 ng/ml) con o sin anticuerpo durante 18 horas. Las actividades de luciferasa dual se desarrollan con el kit de luciferasa Promega dual. Además, se utilizó ARNi de GPR49 para examinar la contribución específica de GPR49 a la actividad indicadora de  $\beta$ -catenina/TCF dependiente de RSPO.

10 Resultados: No se observó actividad medible en los ensayos de actividad de cAMP, flujo de calcio o  $\beta$ -arrestina para RSPO.

Sin embargo, la RSPO condujo la actividad indicadora de  $\beta$ -catenina/TCF de una manera dependiente de la dosis que fue eliminado por el ARNi de GPR49.

#### Ejemplo 14

15 Estimulación de células GPR49-3T3 con R-espondina-1

Procedimientos: Para probar los efectos de R-espondina en la proliferación de células sobreexpresadas con GPR49, se incubaron 2500 células de fibroblastos NIH 3H3 transfectadas de manera estable con GPR49 (clon 50 de GPR49-3T3) con R-espondina 1 durante 2 días y se utilizó el ensayo Cell Titer Glo ATP para evaluar la proliferación celular. Se demostró previamente que el clon 50 de GPR49-3T3 expresaba altos niveles de GPR49 en la superficie celular mediante FAC con Abm 76C12 anti-GPR49.

20 Resultados: La estimulación con R-espondina 1 causó un aumento del 25-40 % en la proliferación celular de las células GPR49-3T3 en comparación con la estimulación de control con Stanniocalcin en condiciones sin suero. Este resultado se confirmó en un segundo experimento independiente utilizando un clon diferente, el clon 28 de GPR49-3T3, que mostró un aumento de 4 veces en la proliferación en respuesta a R-espondina 1 en comparación con las células estimuladas con control de Stanniocalcin.

#### Ejemplo 15

Inhibición de la unión de R-espondina por los Abm GPR49

Se determinó la capacidad de los Abm anti-GPR49 detallados en la presente invención para bloquear la unión de RSPO a GPR49-Fc soluble.

30 Procedimientos: Se determinó la capacidad de bloqueo del ligando de los anticuerpos anti-GPR49 mediante un ensayo de resonancia de plasmón de superficie de competición en fase de solución. En resumen, se incubaron conjuntamente los anticuerpos (1  $\mu$ M) con RSPO 200 nM durante 45 minutos en hielo. La RSPO sola (200 nM) o en combinación con anticuerpos incubados se hizo fluir sobre un chip Biacore CM5 inmovilizado con GPR49-Fc (como se detalla en el Ejemplo 2). La  $R_{max}$ , que es la señal de enlace al final de la fase de asociación de 60 segundos ( $R_{max}$ ) se utilizó como una medida de la fracción unida en el estado estable/equilibrio.

35 Resultados: Los anticuerpos 3B8.11, 10A6.7, 2B5.5, 6C10.5 anti-GPR49 disminuyeron todos los valores de  $R_{max}$  superiores al 20 %. 3G8.1, 6H5.4 y 7F8.2 todos disminuyeron la  $R_{max}$  en menos del 20 %.

#### Ejemplo 16

40 Reactividad y especificidad cruzada de Abm GPR49 para miembros de la familia relacionados GPR48 (LGR4) y LGR6

Procedimientos: Con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos anti-GPR49 detallados en la presente invención para miembros de la familia relacionados, GPR48 (LGR4) y LGR6, GPR48 recombinante, GPR49 y LGR6 se expresaron independientemente en células de mamíferos (HEK293T). Se evaluó la unión de anticuerpos a células que sobreexpresan los receptores mediante FACS (procedimientos estándar) y se comparó con las células transfectadas con el vector de control (pV100).

45 Resultados: El anticuerpo 76C12 se une a GPR48 pero no a LGR6 expresado en células de mamíferos. Ninguno de los otros anticuerpos de prueba se une a GPR48 o LGR6 (Tabla 6)

Tabla 6

	GPR48 humano (LGR4)	LGR6 humano
76C12	Y	N
78F05	N	N
1B8.1	N	N
14E3.1	N	N
14A8.1	N	N
14F7.1	N	N
18G7.1	N	N
6H5.4	N	N
7C3.4	N	N
7F8.2	N	N
14H9.1	N	N
9C7.3	N	N
1B3.5	N	N

**Ejemplo 17**Internalización de GPR49 mediante anticuerpos anti-GPR49 completamente humanos

- 5 Procedimientos: Se sembraron células de tumor de colon Lovo a 50.000 células por pocillo en portaobjetos con cámara de 8 pocillos (portaobjetos de cultivo recubiertos con Colágeno Tipo 1 de Becton Dickinson, BD BioCoat™ n.º 354630) 48 horas antes de los procedimientos de tinción. Las células se mantuvieron rutinariamente por debajo de 20 pasajes. El día de los procedimientos de tinción, se descartaron los medios de cultivo de cada pocillo y se reemplazaron con 500 ul de tampón de incubación en frío (MEM Eagle ATCC n.º 30-2003 + BSA al 1 %). Se lavaron las células 2 veces con este tampón durante 3 minutos cada lavado. Luego, se agregaron al pocillo apropiado 250 ul de cada Abm (76C12, 78F05 y 10A9.2 murino) que se analizaron, a una concentración de 10 ug/ml, se diluyeron en medios de incubación y se incubaron en hielo durante 1 hora. Se utilizó un anticuerpo humano anti-IGF-1R humano como control positivo para comparar el grado de internalización. Se utilizaron el anticuerpo 5A7 (anti-Id), IDEC152 y ningún anticuerpo como controles negativos. Después de 45 minutos de incubación en hielo, el portaobjetos tiempo cero (t = 0') se lavó 3 veces con 500 ul de tampón de lavado frío (PBS + BSA al 1 % + suero de cabra al 2 %) durante 3 minutos cada lavado (los portaobjetos siempre se mantuvieron en hielo). El portaobjetos t = 0 se fijó luego con 500 ul de paraformaldehído al 14 % (diluido con PBS a partir de un stock al 16 %; EMS n.º 15710) durante 15 minutos a temperatura ambiente. El portaobjetos t = 0 se lavó de nuevo 3 veces con tampón de lavado frío durante 3 minutos cada lavado, luego se dejó en hielo. Mientras tanto, los portaobjetos restantes se colocaron en una incubadora a 37 °C para sus puntos de tiempo designados (15 y 60 minutos). Al final de su tiempo de incubación, cada portaobjetos siguió los mismos procedimientos que los lavados anteriores y la fijación, y se pusieron en hielo. Todos los portaobjetos se permeabilizaron luego con 200 ul de tampón de permeabilización en frío (tampón de lavado + Triton-X al 0,5 %) durante 10 minutos en hielo. Todos los portaobjetos se lavaron 3 veces con 500 (xl de tampón de lavado frío durante 3 minutos cada lavado). Se preparó el anticuerpo secundario a una dilución 1:1000 (AlexaFluor 488 anti-IgG de ratón de cabra (H + L), Sondas moleculares n.º A11029 para los Abm y AlexaFluor 488 anti-IgG humana de cabra (H + L), sondas moleculares n.º A11013 para anticuerpos G4) en tampón de lavado, después de una vuelta inicial del vial de reserva a 10.000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Se añadieron 250 ul del anticuerpo secundario diluido a cada pocillo y se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente en oscuridad (cubiertos). Los portaobjetos se lavaron de nuevo 3 veces con 500 ul de tampón de lavado frío. En el lavado final, se desechó el tampón y todos los pocillos se dejaron vacíos. Luego, se desmontaron las cámaras del portaobjetos utilizando la herramienta de desmontaje provista y los cubreobjetos se montaron con un medio de montaje Vectashield que contiene DAPI (Vector n.º H-1500, Hard Set™). Los portaobjetos se almacenaron a 4 °C en oscuridad durante la noche para permitir que el medio de montaje se seque. Las imágenes de los portaobjetos se tomaron con un microscopio confocal utilizando el programa LaserSharp 2000 (BioRad v5.2) y se representaron como una combinación de componentes azul y verde del promedio de Kalman 10.

Resultados: 76C12, 78F05 y 10A9.2 mostraron una rápida internalización de GPR49 en 60 min. Como se esperaba, el control positivo, IGF1R C06, mostró internalización del receptor IGF1R, mientras que los controles negativos con isotipo coincidente (5A7 de ratón, IDEC152 (anticuerpo primatizado)) no se unieron ni se internalizaron.

**Ejemplo 18**Los anticuerpos GPR49 se unen a GPR49 murino

Procedimientos: Con el fin de determinar la especificidad de los anticuerpos anti-GPR49 descritos en el presente

documento para GPR49 murino, se expresó GPR49 murino recombinante en células de mamífero (HEK293T). Se evaluó la unión de anticuerpos a células que sobreexpresan los receptores mediante FACS (procedimientos estándar) y se comparó con las células transfectadas con el vector de control (pV100).

- 5 Resultados: 76C12 se une al GPR49 murino expresado en células de mamíferos con alta afinidad. Los múltiples Abm de GPR49 adicionales se unen al GPR49 murino (Tabla 7).

**Tabla 7**

	<b>GPR49 murino (Lgr5)</b>
76C12	ALTA
78F05	BAJA
IB8.1	MEDIA
14E3.1	MEDIA
14A8.1	MEDIA
14F7.1	MEDIA
18G7.1	BAJA
6H5.4	BAJA
7C3.4	BAJA
7F8.2	BAJA
14H9.1	BAJA
9C7.3	+/-
1B3.5	+/-

### **Ejemplo 19**

#### Agrupamiento de epítomos de Abm anti-GPR49

- 10 Se desarrolló un ensayo de unión en equilibrio y se utilizó para determinar grupos de unión a epítomo comunes para el panel de anticuerpos GPR49 detallados en la presente invención. El bloqueo cruzado de la unión a GPR49 se utilizó para definir grupos de anticuerpos que se unen a distintos epítomos de unión de GPR49.

- 15 Procedimientos: La actividad de unión de GPR49-Fc al Abm anti-GPR49 de prueba se comparó con la de GPR49-Fc preincubado con el Abm de prueba secundario (ya sea el mismo Abm o diferente) en un ensayo basado en interferometría de biocapa. El Abm primario de prueba anti-GPR49 (Abm primario) se biotiniló con un Thermo Scientific EZ-Link Sulfo-NHS-Biotina (Thermo Scientific, n.º 21425) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El Abm primario biotinilado, GPR49-Fc y GPR49-Fc más el Abm anti-GPR49 secundario (Abm secundario) se diluyeron en tampón OB (PBS, pH 7,4, NaN3 al 0,01 % (p/v), BSA 1 mg/ml, Tween 20 al 0,02 % (v/v)). Los Abm primarios biotinilados se capturaron en puntas de octetos de estreptavidina (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA; Parte n.º 18-5001), utilizando un sistema Octet Red (ForteBio, Inc., Menlo Park, CA). Se lavaron las puntas en tampón OB y se trasladaron a pocillos que contenían GPR49-Fc en tampón OB. La unión de GPR49-Fc al Abm primario en las puntas se registró como señales de biointerferometría a saturación, durante una fase de asociación (120 segundos) y la señal de unión al final de la fase de asociación ( $R_{max}$ ) se utilizó como una medida de la fracción unida a estado estable/equilibrio. También se registró la unión durante la fase de disociación (120 segundos). Para medir la capacidad de bloqueo cruzado de los diferentes Abm entre sí, se realizó un segundo experimento de unión en el que el GPR49-Fc descrito anteriormente, se preincubó con un exceso molar de 5 veces del Abm de prueba secundario (no biotinilado). Luego se unió a las puntas de precarga con Abm primario biotinilado para determinar la  $R_{max}$ '. Luego se comparó el primer  $R_{max}'$  con el  $R_{max}$  y se calculó el porcentaje de  $R_{max}'/R_{max}$  para determinar la cantidad de bloqueo que tenía el Abm secundario en la capacidad de GPR49-Fc para unirse al Abm primario previamente unido a la punta. El bloqueo cruzado ( $R_{max}'/R_{max} \times 100$ ) de Abm secundarios a primarios se registró de la siguiente manera: 0-25 % de bloqueo cruzado completo, 25-50 % de bloqueo cruzado parcial, 50-75 % de bloqueo cruzado bajo, 75-100 % sin bloqueo cruzado. Todos los Abm se probaron contra sí mismos (los Abm primarios y secundarios fueron el mismo Abm de prueba) para garantizar un análisis adecuado.

- 35 Resultados: Se observaron seis grupos de unión a epítomos distintos para los Abm anti-GPR49 analizados. Los grupos son: grupo 1 (76C12, 1B3.5, 6B10.2, 4F6.2), grupo 2 (18G7.1, 14A8.1, 5B10.1, 14F7.1, 11F6.1, 14E3.1, 1B8.1), grupo 3 (5F2.5, 6B10.2), grupo 4 (3F11.1), grupo 5 (10A.2) y grupo 6 (6E10.1). El bloqueo cruzado por auto-Abm se muestra en la Tabla 8 y 9.

Tabla 8

	18G7.1	1B3.5	76C12	14A8.1	5B10.1	14F7.1	5D6.3	5F2.5
18G7.1	11	100	100	20	28	14	62	100
1B3.5	100	4	7	100	100	100	47	100
76C12	100	4	5	100	100	100	25	100
14A8.1	5	100	100	6	9	4	99	100
5B10.1	13	100	100	16	11	14	76	100
14F7.1	7	100	100	7	11	5	100	100
5D6.3	100	96	81	100	100	100	66	97
5F2.5	100	100	100	100	100	100	79	13
11F6.1	9	100	100					93
3F11.1	78	68	100					100
14E3.1	5	88	95					83
1B8.1	6	85	96					85

Tabla 9

	11F6.1	3F11.1	14E3.1	1B8.1	10A9.2	6B10.2	4F6.2	6E10.1
18G7.1								
1B3.5								
76C12					100	4	6	100
14A8.1								
5B10.1								
14F7.1								
5D6.3								
5F2.5					100	8	100	100
11F6.1	4	99	0	1	100	100	100	100
3F11.1	100	5	86	75	100	100	100	100
14E3.1	4	87	2	0				
1B8.1	5	86	2	3				

**Ejemplo 20**

5 Los Abm GPR49 inhiben el crecimiento de células madre cancerosas *in vitro*

Se probaron los Abm GPR49 para determinar su capacidad para inhibir el crecimiento de células madre cancerosas en un ensayo de esferas tumorales de células madre de cáncer de colon.

10 Procedimientos: Las esferas tumorales se establecieron como se describió anteriormente en el ejemplo 1, y se sembraron en presencia de Abm GPR49, o isotipo de control IgG1 a 1-2000 células por pocillo en placas de fijación ultra baja. En un experimento, se utilizaron Abm de prueba y control para tratar las esferas tumorales de colon primario CT1 que se colocaron en placas a 1, 2 o 10 células por 96 pocillos/placa en medio de células madre cancerosas (Figuras 12A y 12B). Además, se realizó una segunda selección como la anterior, pero con esferas tumorales de colon de células de tumor de colon primario CT3. CT1 y CT3 son líneas celulares de tumores de colon que se originaron a partir de muestras de biopsias de pacientes con tumores de colon recientes y se utilizaron para establecer líneas de células madre de cáncer de colon (esfera tumoral). Se consideran líneas "primarias" porque son pasajes bajos (<10 pasajes) procedentes recientemente de las muestras primarias del paciente. Se consideran líneas de células madre cancerosas porque se cultivan en condiciones de células madre cancerosas establecidas (medio sin suero) y placas de baja unión (las células crecen en suspensión).

20 Resultados: 76C12 causó un promedio del 44 % de inhibición del crecimiento (n > 10 experimentos) y 78F05 causó un promedio del 37 % de inhibición del crecimiento (4 experimentos) en el número de esferas tumorales o células madre cancerosas (procedentes de la línea de tumor de colon CT1) después de 14 días (Figura 13). También se analizaron los anticuerpos murinos con el ensayo de esferas tumorales y dieron como resultado 9 con una inhibición superior al 20 % del crecimiento de las células madre cancerosas. Un Abm humano (76B04) y 38 Abm anti-GPR49 murinos no mostraron inhibición del crecimiento de esferas tumorales. Los datos se muestran en la tabla 10. Los cinco principales Abm GPR49 de arriba también se analizaron en un ensayo de células madre cancerosas CT3 (esfera tumoral) y mostraron una inhibición del crecimiento de entre 52 a 37 % (Tabla 11). Finalmente, el Abm 76C12



de GPR49 mostró una inhibición del crecimiento del 27 % contra las células madre cancerosas procedentes de la línea de células tumorales de colon DLD1 (promedio de 5 experimentos).

**Tabla 10: Resumen de Abm del ensayo de células madre cancerosas CT1 (esfera tumoral)**

Abm	Inhibición de la esfera tumoral del colon CT1 (%)	Tipo de anticuerpo	Valor p	Datos reproducibles en (N) experimentos
76C12	44	Humano	p = 0,007	> 10
18G7.1	37	Ratón 2G	p = 0,008	2
78F05	27	Humano	p = 0,04	4
5D6.3	30	1º gen de ratón	p = 0,008	2
1B3.5	28	1º gen de ratón	p = 0,008	3
14A8.1	27	Ratón 2G	p = 0,02	2
5B10.1	24	Ratón 2G	p = 0,008	3
14F7.1	20	Ratón 2G	p = 0,002	3
5F2.5	21	1º gen de ratón	p = 0,04	1
7C3.4	20	1º gen de ratón	p = 0,02	1
8E9.1	20	Ratón 2G		

**Tabla 11: Resumen de Abm del ensayo de células madre cancerosas CT3 (esfera tumoral)**

Abm	Inhibición de la esfera tumoral del colon CT3 (%)	Tipo de anticuerpo	Datos reproducibles en (N) experimentos
76C12	52	Humano	3
18G7.1	42	Ratón 2G	3
78F05	37	Humano	3
5D6.3	37	1º gen de ratón	3
1B3.5	46	1º gen de ratón	3

## 5 Ejemplo 21

### Inhibición *in vivo* de tumores primarios de cáncer de colon con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53 utilizando anticuerpos GPR49

Se realizó un experimento para determinar si los anticuerpos GPR49 eran eficaces *in vivo* para inhibir los cánceres de colon que tenían mutaciones particulares que pueden conducir a la resistencia a terapias contra el cáncer conocidas. Por ejemplo, los pacientes con la mutación KRAS pueden tener una respuesta pobre al tratamiento con panitumuAbm (Vectibix®) y cetuxiAbm (Erbix®) en el cáncer colorrectal. Por lo tanto, se quiso determinar si los anticuerpos GPR49 podrían proporcionar un tratamiento útil para los cánceres de colon con estos marcadores de resistencia terapéutica conocidos.

**Procedimientos:** Se evaluó el agente único de eficacia *in vivo* de los anticuerpos murinos 14F7.1, 18G7.1, 5B10.1, 14A8.1, 1B3.5 en un sistema de modelo de xenoinjerto de tumor de colon primario utilizando células de xenoinjerto primario CT1. CT1 es un tumor de xenoinjerto *in vivo* de cáncer colorrectal primario (CCR) establecido a partir de una muestra de tumor de paciente de CCR nueva. El estado mutacional de las células tumorales se determinó mediante la secuenciación profunda de Ion Torrent® (Life Technologies, Carlsbad, CA) para identificar mutaciones de oncogenes. Aproximadamente el 5-15 % de los tumores CT1 expresan GPR49. Se inocularon ratones hembra SCID beige con células tumorales CT1 y se monitorizó el crecimiento del tumor. Los ratones se asignaron al azar en grupos de 10 cuando el volumen medio del tumor alcanzó 175 mm<sup>3</sup>. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 15 mg/kg, dos veces por semana durante 4 semanas. Se administró un anticuerpo IgG1 de isotipo compatible como control negativo a 15 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Los volúmenes tumorales y los pesos corporales se midieron 2 veces por semana.

**Resultados:** Los anticuerpos inhibieron el crecimiento del tumor hasta un 40 % en comparación con el control (Figura 14 y 15). Los anticuerpos 14F7 y 18G7 mostraron la mayor inhibición del crecimiento del tumor (40 % y 34 % de inhibición del tumor, respectivamente). El 34 % y el 40 % de inhibición del crecimiento tumoral por los anticuerpos es un efecto "demasiado grande" ya que GPR49 solo se expresa en aproximadamente el 5-15 % de las células tumorales. Este efecto exagerado sugiere que la inhibición de anticuerpos de las células madre positivas para el cáncer GPR49 se dirige a la fuente de la proliferación de las células tumorales *in vivo*.

**Ejemplo 22****Inhibición *in vivo* de tumores de colon primarios con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53 por anticuerpos GPR49 en combinación con el quimioterapéutico Irinotecan**

5 También se realizó un experimento para determinar si los anticuerpos GPR49 en combinación con agentes terapéuticos contra el cáncer bien conocidos serían eficaces *in vivo* para inhibir los cánceres de colon que tenían mutaciones particulares que pueden conducir a la resistencia a terapias contra el cáncer conocidas.

10 **Procedimientos:** Se evaluó el agente único de eficacia *in vivo* de los anticuerpos murinos 14F7.1, 18G7.1, 5B10.1, 14A8.1, 1B3.5 en un sistema de modelo de xenoinjerto de tumor de colon primario utilizando células de xenoinjerto primario CT1. CT1 es un tumor de xenoinjerto *in vivo* de colorrectal primario (CCR) establecido a partir de una muestra de tumor de paciente de CCR nueva. El estado mutacional se determinó mediante la secuenciación profunda de Ion Torrent para identificar mutaciones en el oncogén. Aproximadamente el 5-15 % de los tumores CT1 expresan GPR49. Se inocularon ratones hembra SCID beige con células tumorales CT1 y se monitorizó el crecimiento del tumor. Los ratones se asignaron al azar el día 0 en grupos de 10 cuando el volumen medio del tumor alcanzó 175 mm<sup>3</sup>. El quimioterapéutico Irinotecan se administró IP a 10 mg/kg una vez al día durante los primeros 5 días. Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 15 mg/kg administrados dos veces por semana durante 4 semanas. Los tumores se midieron en los intervalos indicados después de la inoculación para el volumen total del tumor.

15 **Resultados:** Los anticuerpos anti-GPR49 en combinación con irinotecan inhibieron el crecimiento tumoral en un 57 % a 65 %, en comparación con el 45 % de inhibición tumoral por Irinotecan solo (Figura 14, Figura 16). Por lo tanto, los anticuerpos GPR49 aumentaron la actividad antitumoral de Irinotecan en un 27 % a 44 % en los cánceres de colon que se sabe son resistentes a ciertos agentes terapéuticos disponibles.

**Ejemplo 23****Inhibición *in vivo* de tumores primarios de cáncer de colon con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN, H-Ras, APC, TP53, FGFR2, VANGL2, STK11, JAK2 y RB1**

25 Se realizó un experimento para determinar si los anticuerpos GPR49 serían eficaces como inhibidores de agente único de los tumores de cáncer de colon que tenían mutaciones particulares que pueden conducir a la resistencia a terapias contra el cáncer conocidas. Se determinó, anteriormente, que los anticuerpos GPR49 en combinación con agentes terapéuticos contra el cáncer bien conocidos eran eficaces. En este experimento, se determinó la inhibición relativa del crecimiento tumoral tras el tratamiento con anticuerpos GPR49 en comparación con el tratamiento de control.

30 **Procedimientos:** Se evaluó el agente único de eficacia *in vivo* de los anticuerpos murinos 18G7.1 y 7C3.4. en un sistema de modelo de xenoinjerto de tumor de colon primario utilizando células CT3 (cáncer de colon primario). CT3 es un xenoinjerto de tumor de colon primario procedente de una muestra de tumor de un paciente con CCR nuevo y se mantiene *in vivo* con un número de pases bajo ( $p < 4$ ). El estado mutacional se determinó mediante la secuenciación profunda de Ion Torrent para identificar mutaciones en el oncogén. Aproximadamente el 15-20 % de los tumores CT3 expresan GPR49. Se inocularon ratones hembra CB17-Scid con células CT3 y se monitorizó el crecimiento tumoral. Los ratones se asignaron al azar en grupos de 10 cuando el volumen medio del tumor alcanzó 130 mm<sup>3</sup> (Día 0). Los anticuerpos se administraron por vía intraperitoneal (i.p.) a 15 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. Se administró un anticuerpo IgG1 de isotipo compatible como control negativo a 15 mg/kg dos veces por semana durante 4 semanas. El volumen del tumor y el peso corporal se midieron dos veces por semana hasta la finalización del estudio.

35 **Resultados:** Los anticuerpos inhibieron el crecimiento del tumor hasta un 43 %, en comparación con el tratamiento de control (Figura 17). Esta inhibición del crecimiento tumoral de  $> 40$  % es un efecto "demasiado grande" dado que los anticuerpos GPR49 solo se unen a una subpoblación del 15-20 % de las células tumorales CT3. Este efecto exagerado sugiere que la inhibición de las células madre cancerosas positivas para GPR49 se dirige a la fuente de la proliferación de las células tumorales *in vivo*.

**Ejemplo 24****El tratamiento con Abm GPR49 reduce la frecuencia de células madre cancerosas *in vivo* en tumores de colon primarios que tienen mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN y p53**

50 Se realizó un experimento para evaluar el impacto de los anticuerpos GPR49 en la frecuencia de células madre cancerosas en células procedentes de tumores de cáncer de colon que tuvieron mutaciones particulares que pueden conducir a la resistencia a terapias contra el cáncer conocidas. Se observó que los anticuerpos GPR49 demostraron un impacto relativo en el crecimiento del tumor que estaba "sobredimensionado" en comparación con la proporción de células tumorales unidas. Este experimento fue para determinar específicamente el efecto de estos anticuerpos en la frecuencia de las células madre cancerosas.

**Procedimientos:** Las células tumorales CT1 aisladas del control, el Abm GPR49, el irinotecán y el Abm GPR49 en combinación con el tratamiento con irinotecán y los grupos de control de los estudios *in vivo* descritos en los ejemplos 1 y 2 se recolectaron, se juntaron, se disociaron y se reimplantaron en un ensayo de trasplante secundario con dilución limitante para medir la frecuencia de las células madre cancerosas. Para cada grupo de tratamiento, se implantaron 8 ratones con 30, 100 y 300 células. La formación de tumores (es decir, la toma de tumores) y la tasa de crecimiento se controlaron cada dos semanas durante 8 semanas. Para calcular la frecuencia de las células madre cancerosas en cada grupo de tratamiento, se realizó un análisis de regresión lineal con Prism GraphPad™ para calcular la frecuencia de las células madre cancerosas en cada grupo de tratamiento. Este ensayo se considera el estándar de oro para medir CMC, porque es un ensayo de CMC funcional que mide la frecuencia de los clones de CMC en cualquier tumor dado que puede dar lugar a un nuevo tumor en un hospedador secundario. En este ensayo, los tumores que contenían las CMC que se medirían se trasplantaron en serie a receptores secundarios en el ensayo de dilución limitante. El ensayo es, por lo tanto, una medida funcional *in vivo* de la capacidad de auto renovación, un componente clave de cualquier célula madre. No se basa en la comprensión y caracterización aún incompletas de los marcadores de la superficie celular o los ensayos enzimáticos que se utilizan a menudo para medir las CMC *in vitro*.

**Resultados:** El recrecimiento tumoral de Abm GPR49 y Abm GPR49 en combinación con tumores tratados previamente con Irinotecan se inhibió significativamente (Figura 18). Más del 62 % (5/8) de los ratones implantados con Abm GPR49 o Abm GPR49 + tumores tratados previamente con Irinotecan no pudieron mostrar la formación de tumores (es decir, estaban libres de tumores) 8 semanas después del trasplante. En cambio, solo 1/8 ratones (13 %) implantados con tumores tratados con control permanecieron sin tumores 8 semanas después del trasplante. El análisis de regresión lineal mostró una reducción de 3 veces en el número de CMC después del tratamiento con anticuerpo GPR49 en comparación con los controles (Figura 18).

#### Ejemplo 25

**El tratamiento con Abm GPR49 reduce la frecuencia de las células madre cancerosas *in vivo* en tumores de colon primarios con mutaciones K-Ras, PI3K, PTEN, H-Ras, APC, TP53, FGFR2, VANGL2, STK11, JAK2 y RB1.**

Se realizó un experimento para determinar si los anticuerpos GPR49 tuvieron un impacto similar en las células cancerosas que albergan una gran variedad de mutaciones que conducen a resistencias a terapias contra el cáncer conocidas. Ampliando los resultados anteriores, se determinó el efecto de estos anticuerpos en la frecuencia de células madre cancerosas en líneas celulares de cáncer que albergan un número mayor de mutaciones.

**Procedimientos:** Las células tumorales primarias CT3 aisladas del control, el Abm GPR49, Irinotecan y los tumores tratados con Abm GPR49 + Irinotecan de los grupos de tratamiento y control en el estudio *in vivo* descrito en el ejemplo 3 se recolectaron, se juntaron, se disociaron y se reimplantaron en un ensayo de trasplante secundario con dilución limitante para medir la frecuencia de las células madre cancerosas. Para cada grupo de tratamiento, se implantaron 8 ratones con 10, 30 y 100 células. La formación de tumores y la tasa de crecimiento se controlaron cada dos semanas durante 12 semanas. Para calcular la frecuencia de las células madre cancerosas en cada grupo de tratamiento, se realizó un análisis de regresión lineal con Prism GraphPad™ para calcular la frecuencia de las células madre cancerosas en cada grupo de tratamiento. Este ensayo se considera el estándar de oro para medir CMC, porque es un ensayo de CMC funcional que mide la frecuencia de los clones de CMC en cualquier tumor dado que puede dar lugar a un nuevo tumor en un hospedador secundario. En este ensayo, los tumores que contenían las CMC que se medirían se trasplantaron en serie a receptores secundarios en el ensayo de dilución limitante. El ensayo es, por lo tanto, una medida funcional *in vivo* de la capacidad de auto renovación, un componente clave de cualquier célula madre. No se basa en la comprensión y caracterización aún incompletas de los marcadores de la superficie celular o los ensayos enzimáticos que se utilizan a menudo para medir las CMC *in vitro*.

**Resultados:** El tratamiento con Abm GPR49 redujo la frecuencia de CMC en 5 veces en comparación con el control (Figura 19).

#### Ejemplo 26

**El tratamiento con Abm GPR49 en combinación con el quimioterapéutico irinotecan evita que las células tumorales del colon formen nuevos tumores en receptores secundarios.**

Se realizó un experimento para determinar si el tratamiento *in vivo* de xenoinjertos de tumor de colon con Abm GPR49 en combinación con irinotecán evitaría que las células tumorales de colon formen nuevos tumores en receptores secundarios. La nueva formación de tumores secundarios en sujetos implantados con células tumorales tratadas previamente es una medida aproximada de la frecuencia de las células madre tumorales en la población de células cancerosas. Se quiso determinar el efecto de los anticuerpos GPR49 y el irinotecán en combinación en la formación de tumores secundarios en sujetos que reciben células de tumores de colon.

**Procedimientos:** Las células tumorales aisladas del control o tumores tratados con Abm GPR49 + irinotecan del estudio *in vivo* descrito en el ejemplo 3 se recolectaron, se juntaron, se disociaron y se reimplantaron en un ensayo de trasplante secundario con dilución limitante para medir la frecuencia de las células madre cancerosas. Para cada

grupo de tratamiento, se implantaron 8 ratones con 10, 30 y 100 células. La formación de tumores se controló cada dos semanas durante 12 semanas.

5 **Resultados:** Después de un seguimiento de 140 días, no se observó crecimiento tumoral de un grupo de Abm GPR49 + irinotecan (0/8 ratones con tumores). En cambio, 5/8 animales implantados con ratones de control tratados con irinotecan formaron tumores con un tamaño promedio de 1729 mm<sup>3</sup> (Figura 20). Esto mostró que el tratamiento con anticuerpos GPR49 destruyó los tumores y redujo en gran medida la capacidad de las células madre cancerosas para seguir proliferando, incluso después de que se suspendiera el tratamiento con los anticuerpos GPR49.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> Bionomics, Inc.  
Reyes, Christopher L.  
Chu, Peter  
Tan, Xiangyang  
Yang, Weixing  
Graff, Christilyn
- 15 <120> PROCEDIMIENTOS PARA BLOQUEAR EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS MADRE CANCEROSAS  
<130> BIONO.001WO  
  
<150> 61/554.426  
<151> 01/11/2011  
  
<160> 6
- 20 <170> FastSEQ para Windows versión 4.0  
  
<210> 1  
<211> 907  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens
- 25 <400> 1

ES 2 697 674 T3

Met Asp Thr Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu  
1 5 10 15  
Gln Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg  
20 25 30  
Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu  
35 40 45  
Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu  
50 55 60  
Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln  
65 70 75 80  
Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg  
85 90 95  
Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly  
100 105 110  
Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His  
115 120 125  
Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg  
130 135 140  
Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly  
145 150 155 160  
Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu  
165 170 175  
Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr  
180 185 190  
Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn  
195 200 205  
Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser  
210 215 220  
Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp  
225 230 235 240  
Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu  
245 250 255  
Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile  
260 265 270  
Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe

ES 2 697 674 T3

		275					280				285				
Tyr	Asp	Asn	Pro	Ile	Gln	Phe	Val	Gly	Arg	Ser	Ala	Phe	Gln	His	Leu
	290					295					300				
Pro	Glu	Leu	Arg	Thr	Leu	Thr	Leu	Asn	Gly	Ala	Ser	Gln	Ile	Thr	Glu
305					310					315					320
Phe	Pro	Asp	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Asn	Leu	Glu	Ser	Leu	Thr	Leu	Thr
				325					330						335
Gly	Ala	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Thr	Val	Cys	Asn	Gln	Leu	Pro
			340					345					350		
Asn	Leu	Gln	Val	Leu	Asp	Leu	Ser	Tyr	Asn	Leu	Leu	Glu	Asp	Leu	Pro
		355				360						365			
Ser	Phe	Ser	Val	Cys	Gln	Lys	Leu	Gln	Lys	Ile	Asp	Leu	Arg	His	Asn
	370					375					380				
Glu	Ile	Tyr	Glu	Ile	Lys	Val	Asp	Thr	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Leu
385					390					395					400
Arg	Ser	Leu	Asn	Leu	Ala	Trp	Asn	Lys	Ile	Ala	Ile	Ile	His	Pro	Asn
			405						410						415
Ala	Phe	Ser	Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn
			420					425					430		
Leu	Leu	Ser	Ser	Phe	Pro	Ile	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Leu	Thr	His	Leu
		435					440						445		
Lys	Leu	Thr	Gly	Asn	His	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Glu	Asn
	450					455					460				
Phe	Pro	Glu	Leu	Lys	Val	Ile	Glu	Met	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Cys	Cys
465					470					475					480
Ala	Phe	Gly	Val	Cys	Glu	Asn	Ala	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Trp	Asn
				485					490					495	
Lys	Gly	Asp	Asn	Ser	Ser	Met	Asp	Asp	Leu	His	Lys	Lys	Asp	Ala	Gly
		500					505						510		
Met	Phe	Gln	Ala	Gln	Asp	Glu	Arg	Asp	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp
	515						520					525			
Phe	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	His	Ser	Val	Gln	Cys	Ser	Pro	Ser
	530					535					540				
Pro	Gly	Pro	Phe	Lys	Pro	Cys	Glu	His	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Leu	Ile
545					550					555					560
Arg	Ile	Gly	Val	Trp	Thr	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Thr	Cys	Asn	Ala
				565					570						575
Leu	Val	Thr	Ser	Thr	Val	Phe	Arg	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ser	Pro	Ile
		580						585					590		
Lys	Leu	Leu	Ile	Gly	Val	Ile	Ala	Ala	Val	Asn	Met	Leu	Thr	Gly	Val
	595					600						605			
Ser	Ser	Ala	Val	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Phe
	610					615				620					
Ala	Arg	His	Gly	Ala	Trp	Trp	Glu	Asn	Gly	Val	Gly	Cys	His	Val	Ile
625					630					635					640
Gly	Phe	Leu	Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	Leu	Thr
				645					650						655
Leu	Ala	Ala	Leu	Glu	Arg	Gly	Phe	Ser	Val	Lys	Tyr	Ser	Ala	Lys	Phe
			660					665						670	
Glu	Thr	Lys	Ala	Pro	Phe	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Ile	Ile	Leu	Leu	Cys
	675					680						685			
Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Thr	Met	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser
	690					695				700					
Lys	Tyr	Gly	Ala	Ser	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Leu	Pro	Phe	Gly	Glu	Pro
705					710					715					720
Ser	Thr	Met	Gly	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Cys
				725					730						735
Phe	Leu	Met	Met	Thr	Ile	Ala	Tyr	Thr	Lys	Leu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Asp
		740					745						750		
Lys	Gly	Asp	Leu	Glu	Asn	Ile	Trp	Asp	Cys	Ser	Met	Val	Lys	His	Ile
	755					760						765			
Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Thr	Asn	Cys	Ile	Leu	Asn	Cys	Pro	Val	Ala	Phe
	770					775					780				

ES 2 697 674 T3

```

Leu Ser Phe Ser Ser Leu Ile Asn Leu Thr Phe Ile Ser Pro Glu Val
785                               790                               795                               800
Ile Lys Phe Ile Leu Leu Val Val Val Pro Leu Pro Ala Cys Leu Asn
                               805                               810                               815
Pro Leu Leu Tyr Ile Leu Phe Asn Pro His Phe Lys Glu Asp Leu Val
                               820                               825                               830
Ser Leu Arg Lys Gln Thr Tyr Val Trp Thr Arg Ser Lys His Pro Ser
                               835                               840                               845
Leu Met Ser Ile Asn Ser Asp Asp Val Glu Lys Gln Ser Cys Asp Ser
                               850                               855                               860
Thr Gln Ala Leu Val Thr Phe Thr Ser Ser Ser Ile Thr Tyr Asp Leu
865                               870                               875                               880
Pro Pro Ser Ser Val Pro Ser Pro Ala Tyr Pro Val Thr Glu Ser Cys
                               885                               890                               895
His Leu Ser Ser Val Ala Phe Val Pro Cys Leu
                               900                               905

```

<210> 2  
 <211> 2880  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

5

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (49)...(2772)  
 <400> 2

```

tgctgctctc cgcccgcgtc cggctcgtgg ccccctactt cgggcacc atg gac acc 57
                                                Met Asp Thr
                                                1

tcc cgg ctc ggt gtg ctc ctg tcc ttg cct gtg ctg ctg cag ctg gcg 105
Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu Gln Leu Ala
    5                               10                               15

acc ggg ggc agc tct ccc agg tct ggt gtg ttg ctg agg ggc tgc ccc 153
Thr Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg Gly Cys Pro
    20                               25                               30                               35

aca cac tgt cat tgc gag ccc gac ggc agg atg ttg ctc agg gtg gac 201
Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu Arg Val Asp
                               40                               45                               50

tgc tcc gac ctg ggg ctc tcg gag ctg cct tcc aac ctc agc gtc ttc 249
Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu Ser Val Phe
                               55                               60                               65

acc tcc tac cta gac ctc agt atg aac aac atc agt cag ctg ctc ccg 297
Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln Leu Leu Pro
    70                               75                               80

aat ccc ctg ccc agt ctc cgc ttc ctg gag gag tta cgt ctt gcg gga 345
Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg Leu Ala Gly
    85                               90                               95

aac gct ctg aca tac att ccc aag gga gca ttc act ggc ctt tac agt 393
Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly Leu Tyr Ser
100                               105                               110                               115

ctt aaa gtt ctt atg ctg cag aat aat cag cta aga cac gta ccc aca 441
Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His Val Pro Thr
                               120                               125                               130

```

10

ES 2 697 674 T3

gaa gct ctg cag aat ttg cga agc ctt caa tcc ctg cgt ctg gat gct	489
Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg Leu Asp Ala	
135 140 145	
aac cac atc agc tat gtg ccc cca agc tgt ttc agt ggc ctg cat tcc	537
Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly Leu His Ser	
150 155 160	
ctg agg cac ctg tgg ctg gat gac aat gcg tta aca gaa atc ccc gtc	585
Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asn Ala Leu Thr Glu Ile Pro Val	
165 170 175	
cag gct ttt aga agt tta tcg gca ttg caa gcc atg acc ttg gcc ctg	633
Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr Leu Ala Leu	
180 185 190 195	
aac aaa ata cac cac ata cca gac tat gcc ttt gga aac ctc tcc agc	681
Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn Leu Ser Ser	
200 205 210	
ttg gta gtt cta cat ctc cat aac aat aga atc cac tcc ctg gga aag	729
Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser Leu Gly Lys	
215 220 225	
aaa tgc ttt gat ggg ctc cac agc cta gag act tta gat tta aat tac	777
Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp Leu Asn Tyr	
230 235 240	
aat aac ctt gat gaa ttc ccc act gca att agg aca ctc tcc aac ctt	825
Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu Ser Asn Leu	
245 250 255	
aaa gaa cta gga ttt cat agc aac aat atc agg tcg ata cct gag aaa	873
Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile Pro Glu Lys	
260 265 270 275	
gca ttt gta ggc aac cct tct ctt att aca ata cat ttc tat gac aat	921
Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe Tyr Asp Asn	
280 285 290	
ccc atc caa ttt gtt ggg aga tct gct ttt caa cat tta cct gaa cta	969
Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu Pro Glu Leu	
295 300 305	
aga aca ctg act ctg aat ggt gcc tca caa ata act gaa ttt cct gat	1017
Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu Phe Pro Asp	
310 315 320	
tta act gga act gca aac ctg gag agt ctg act tta act gga gca cag	1065
Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr Gly Ala Gln	
325 330 335	
atc tca tct ctt cct caa acc gtc tgc aat cag tta cct aat ctc caa	1113
Ile Ser Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro Asn Leu Gln	
340 345 350 355	
gtg cta gat ctg tct tac aac cta tta gaa gat tta ccc agt ttt tca	1161
Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro Ser Phe Ser	
360 365 370	
gtc tgc caa aag ctt cag aaa att gac cta aga cat aat gaa atc tac	1209
Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn Glu Ile Tyr	



ES 2 697 674 T3

			375					380					385				
gaa	att	aaa	ggt	gac	act	ttc	cag	cag	ttg	ctt	agc	ctc	cga	tcg	ctg		1257
Glu	Ile	Lys	Val	Asp	Thr	Phe	Gln	Gln	Leu	Leu	Ser	Leu	Arg	Ser	Leu		
		390					395					400					
aat	ttg	gct	tgg	aac	aaa	att	gct	att	att	cac	ccc	aat	gca	ttt	tcc		1305
Asn	Leu	Ala	Trp	Asn	Lys	Ile	Ala	Ile	Ile	His	Pro	Asn	Ala	Phe	Ser		
	405					410				415							
act	ttg	cca	tcc	cta	ata	aag	ctg	gac	cta	tcg	tcc	aac	ctc	ctg	tcg		1353
Thr	Leu	Pro	Ser	Leu	Ile	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Ser	Asn	Leu	Leu	Ser		
420					425					430					435		
tct	ttt	cct	ata	act	ggg	tta	cat	ggt	tta	act	cac	tta	aaa	tta	aca		1401
Ser	Phe	Pro	Ile	Thr	Gly	Leu	His	Gly	Leu	Thr	His	Leu	Lys	Leu	Thr		
				440					445					450			
gga	aat	cat	gcc	tta	cag	agc	ttg	ata	tca	tct	gaa	aac	ttt	cca	gaa		1449
Gly	Asn	His	Ala	Leu	Gln	Ser	Leu	Ile	Ser	Ser	Glu	Asn	Phe	Pro	Glu		
			455					460					465				
ctc	aag	ggt	ata	gaa	atg	cct	tat	gct	tac	cag	tgc	tgt	gca	ttt	gga		1497
Leu	Lys	Val	Ile	Glu	Met	Pro	Tyr	Ala	Tyr	Gln	Cys	Cys	Ala	Phe	Gly		
		470					475					480					
gtg	tgt	gag	aat	gcc	tat	aag	att	tct	aat	caa	tgg	aat	aaa	ggt	gac		1545
Val	Cys	Glu	Asn	Ala	Tyr	Lys	Ile	Ser	Asn	Gln	Trp	Asn	Lys	Gly	Asp		
	485					490						495					
aac	agc	agt	atg	gac	gac	ctt	cat	aag	aaa	gat	gct	gga	atg	ttt	cag		1593
Asn	Ser	Ser	Met	Asp	Asp	Leu	His	Lys	Lys	Asp	Ala	Gly	Met	Phe	Gln		
500					505					510					515		
gct	caa	gat	gaa	cgt	gac	ctt	gaa	gat	ttc	ctg	ctt	gac	ttt	gag	gaa		1641
Ala	Gln	Asp	Glu	Arg	Asp	Leu	Glu	Asp	Phe	Leu	Leu	Asp	Phe	Glu	Glu		
				520					525					530			
gac	ctg	aaa	gcc	ctt	cat	tca	gtg	cag	tgt	tca	cct	tcc	cca	ggc	ccc		1689
Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	His	Ser	Val	Gln	Cys	Ser	Pro	Ser	Pro	Gly	Pro		
			535					540					545				
ttc	aaa	ccc	tgt	gaa	cac	ctg	ctt	gat	ggc	tgg	ctg	atc	aga	att	gga		1737
Phe	Lys	Pro	Cys	Glu	His	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Leu	Ile	Arg	Ile	Gly		
		550					555						560				
gtg	tgg	acc	ata	gca	ggt	ctg	gca	ctt	act	tgt	aat	gct	ttg	gtg	act		1785
Val	Trp	Thr	Ile	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Thr	Cys	Asn	Ala	Leu	Val	Thr		
	565					570					575						
tca	aca	ggt	ttc	aga	tcc	cct	ctg	tac	att	tcc	ccc	att	aaa	ctg	tta		1833
Ser	Thr	Val	Phe	Arg	Ser	Pro	Leu	Tyr	Ile	Ser	Pro	Ile	Lys	Leu	Leu		
580					585					590					595		
att	ggg	gtc	atc	gca	gca	gtg	aac	atg	ctc	acg	gga	gtc	tcc	agt	gcc		1881
Ile	Gly	Val	Ile	Ala	Ala	Val	Asn	Met	Leu	Thr	Gly	Val	Ser	Ser	Ala		
				600					605					610			
gtg	ctg	gct	ggt	gtg	gat	gcg	ttc	act	ttt	ggc	agc	ttt	gca	cga	cat		1929
Val	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Ala	Phe	Thr	Phe	Gly	Ser	Phe	Ala	Arg	His		
			615					620					625				
ggt	gcc	tgg	tgg	gag	aat	ggg	ggt	ggt	tgc	cat	gtc	att	ggt	ttt	ttg		1977

ES 2 697 674 T3

Gly	Ala	Trp	Trp	Glu	Asn	Gly	Val	Gly	Cys	His	Val	Ile	Gly	Phe	Leu		
		630					635					640					
tcc	att	ttt	gct	tca	gaa	tca	tct	gtt	ttc	ctg	ctt	act	ctg	gca	gcc	2025	
Ser	Ile	Phe	Ala	Ser	Glu	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Ala		
	645					650				655							
ctg	gag	cgt	ggg	ttc	tct	gtg	aaa	tat	tct	gca	aaa	ttt	gaa	acg	aaa	2073	
Leu	Glu	Arg	Gly	Phe	Ser	Val	Lys	Tyr	Ser	Ala	Lys	Phe	Glu	Thr	Lys		
660				665						670					675		
gct	cca	ttt	tct	agc	ctg	aaa	gta	atc	att	ttg	ctc	tgt	gcc	ctg	ctg	2121	
Ala	Pro	Phe	Ser	Ser	Leu	Lys	Val	Ile	Ile	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu		
				680					685					690			
gcc	ttg	acc	atg	gcc	gca	gtt	ccc	ctg	ctg	ggt	ggc	agc	aag	tat	ggc	2169	
Ala	Leu	Thr	Met	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Leu	Gly	Gly	Ser	Lys	Tyr	Gly		
			695					700					705				
gcc	tcc	cct	ctc	tgc	ctg	cct	ttg	cct	ttt	ggg	gag	ccc	agc	acc	atg	2217	
Ala	Ser	Pro	Leu	Cys	Leu	Pro	Leu	Pro	Phe	Gly	Glu	Pro	Ser	Thr	Met		
		710					715					720					
ggc	tac	atg	gtc	gct	ctc	atc	ttg	ctc	aat	tcc	ctt	tgc	ttc	ctc	atg	2265	
Gly	Tyr	Met	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	Asn	Ser	Leu	Cys	Phe	Leu	Met		
	725					730					735						
atg	acc	att	gcc	tac	acc	aag	ctc	tac	tgc	aat	ttg	gac	aag	gga	gac	2313	
Met	Thr	Ile	Ala	Tyr	Thr	Lys	Leu	Tyr	Cys	Asn	Leu	Asp	Lys	Gly	Asp		
740					745					750					755		
ctg	gag	aat	att	tgg	gac	tgc	tct	atg	gta	aaa	cac	att	gcc	ctg	ttg	2361	
Leu	Glu	Asn	Ile	Trp	Asp	Cys	Ser	Met	Val	Lys	His	Ile	Ala	Leu	Leu		
				760					765					770			
ctc	ttc	acc	aac	tgc	atc	cta	aac	tgc	cct	gtg	gct	ttc	ttg	tcc	ttc	2409	
Leu	Phe	Thr	Asn	Cys	Ile	Leu	Asn	Cys	Pro	Val	Ala	Phe	Leu	Ser	Phe		
			775					780					785				
tcc	tct	tta	ata	aac	ctt	aca	ttt	atc	agt	cct	gaa	gta	att	aag	ttt	2457	
Ser	Ser	Leu	Ile	Asn	Leu	Thr	Phe	Ile	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Lys	Phe		
		790					795				800						
atc	ctt	ctg	gtg	gta	gtc	cca	ctt	cct	gca	tgt	ctc	aat	ccc	ctt	ctc	2505	
Ile	Leu	Leu	Val	Val	Val	Pro	Leu	Pro	Ala	Cys	Leu	Asn	Pro	Leu	Leu		
	805					810					815						
tac	atc	ttg	ttc	aat	cct	cac	ttt	aag	gag	gat	ctg	gtg	agc	ctg	aga	2553	
Tyr	Ile	Leu	Phe	Asn	Pro	His	Phe	Lys	Glu	Asp	Leu	Val	Ser	Leu	Arg		
820					825					830					835		
aag	caa	acc	tac	gtc	tgg	aca	aga	tca	aaa	cac	cca	agc	ttg	atg	tca	2601	
Lys	Gln	Thr	Tyr	Val	Trp	Thr	Arg	Ser	Lys	His	Pro	Ser	Leu	Met	Ser		
				840					845					850			
att	aac	tct	gat	gat	gtc	gaa	aaa	cag	tcc	tgt	gac	tca	act	caa	gcc	2649	
Ile	Asn	Ser	Asp	Asp	Val	Glu	Lys	Gln	Ser	Cys	Asp	Ser	Thr	Gln	Ala		
			855					860					865				
ttg	gta	acc	ttt	acc	agc	tcc	agc	atc	act	tat	gac	ctg	cct	ccc	agt	2697	
Leu	Val	Thr	Phe	Thr	Ser	Ser	Ser	Ile	Thr	Tyr	Asp	Leu	Pro	Pro	Ser		
		870					875					880					

ES 2 697 674 T3

tcc gtg cca tca cca gct tat cca gtg act gag agc tgc cat ctt tcc 2745  
 Ser Val Pro Ser Pro Ala Tyr Pro Val Thr Glu Ser Cys His Leu Ser  
 885 890 895

tct gtg gca ttt gtc cca tgt ctc taa ttaatatgtg aaggaaaatg 2792  
 Ser Val Ala Phe Val Pro Cys Leu \*  
 900 905

ttttcaaagg ttgagaacct gaaaatgtga gattgagtat atcagagcag taattaataa 2852  
 gaagagctga ggtgaaactc ggtttaaa 2880

<210> 3  
 <211> 802  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> proteína GPR49-Fc-FLAG sintetizada artificialmente

<400> 3

Met Asp Thr Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu  
 1 5 10 15  
 Gln Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg  
 20 25 30  
 Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu  
 35 40 45  
 Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu  
 50 55 60  
 Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg  
 85 90 95  
 Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly  
 100 105 110  
 Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His  
 115 120 125  
 Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg  
 130 135 140  
 Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly  
 145 150 155 160  
 Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu  
 165 170 175  
 Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr  
 180 185 190  
 Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn  
 195 200 205  
 Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser  
 210 215 220  
 Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp  
 225 230 235 240  
 Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu  
 245 250 255  
 Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile  
 260 265 270  
 Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe  
 275 280 285  
 Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu  
 290 295 300  
 Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr  
 325 330 335  
 Gly Ala Gln Ile Ser Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro

```

          340          345          350
Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro
          355          360          365
Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn
          370          375          380
Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu
385          390          395          400
Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn
          405          410          415
Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
          420          425          430
Leu Leu Ser Ser Phe Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu
          435          440          445
Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn
          450          455          460
Phe Pro Glu Leu Lys Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys
465          470          475          480
Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn
          485          490          495
Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly
          500          505          510
Met Phe Gln Ala Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp
          515          520          525
Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser
          530          535          540
Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile
545          550          555          560
Arg Ile Gly Val Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          565          570          575
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          580          585          590
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          595          600          605
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
          610          615          620
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
625          630          635          640
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
          645          650          655
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
          660          665          670
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
          675          680          685
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
          690          695          700
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
705          710          715          720
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
          725          730          735
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
          740          745          750
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
          755          760          765
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
          770          775          780
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
785          790          795          800
Asp Lys

```

<210> 4  
<211> 571

ES 2 697 674 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> proteína GPR49-His sintetizada artificialmente

5

<400> 4

```

Met Asp Thr Ser Arg Leu Gly Val Leu Leu Ser Leu Pro Val Leu Leu
 1      5      10      15
Gln Leu Ala Thr Gly Gly Ser Ser Pro Arg Ser Gly Val Leu Leu Arg
      20      25      30
Gly Cys Pro Thr His Cys His Cys Glu Pro Asp Gly Arg Met Leu Leu
      35      40      45
Arg Val Asp Cys Ser Asp Leu Gly Leu Ser Glu Leu Pro Ser Asn Leu
      50      55      60
Ser Val Phe Thr Ser Tyr Leu Asp Leu Ser Met Asn Asn Ile Ser Gln
      65      70      75      80
Leu Leu Pro Asn Pro Leu Pro Ser Leu Arg Phe Leu Glu Glu Leu Arg
      85      90      95
Leu Ala Gly Asn Ala Leu Thr Tyr Ile Pro Lys Gly Ala Phe Thr Gly
      100      105      110
Leu Tyr Ser Leu Lys Val Leu Met Leu Gln Asn Asn Gln Leu Arg His
      115      120      125
Val Pro Thr Glu Ala Leu Gln Asn Leu Arg Ser Leu Gln Ser Leu Arg
      130      135      140
Leu Asp Ala Asn His Ile Ser Tyr Val Pro Pro Ser Cys Phe Ser Gly
      145      150      155      160
Leu His Ser Leu Arg His Leu Trp Leu Asp Asp Asn Ala Leu Thr Glu
      165      170      175
Ile Pro Val Gln Ala Phe Arg Ser Leu Ser Ala Leu Gln Ala Met Thr
      180      185      190
Leu Ala Leu Asn Lys Ile His His Ile Pro Asp Tyr Ala Phe Gly Asn
      195      200      205
Leu Ser Ser Leu Val Val Leu His Leu His Asn Asn Arg Ile His Ser
      210      215      220
Leu Gly Lys Lys Cys Phe Asp Gly Leu His Ser Leu Glu Thr Leu Asp
      225      230      235      240
Leu Asn Tyr Asn Asn Leu Asp Glu Phe Pro Thr Ala Ile Arg Thr Leu
      245      250      255
Ser Asn Leu Lys Glu Leu Gly Phe His Ser Asn Asn Ile Arg Ser Ile
      260      265      270
Pro Glu Lys Ala Phe Val Gly Asn Pro Ser Leu Ile Thr Ile His Phe
      275      280      285
Tyr Asp Asn Pro Ile Gln Phe Val Gly Arg Ser Ala Phe Gln His Leu
      290      295      300
Pro Glu Leu Arg Thr Leu Thr Leu Asn Gly Ala Ser Gln Ile Thr Glu
      305      310      315      320
Phe Pro Asp Leu Thr Gly Thr Ala Asn Leu Glu Ser Leu Thr Leu Thr
      325      330      335
Gly Ala Gln Ile Ser Ser Leu Pro Gln Thr Val Cys Asn Gln Leu Pro
      340      345      350
Asn Leu Gln Val Leu Asp Leu Ser Tyr Asn Leu Leu Glu Asp Leu Pro
      355      360      365
Ser Phe Ser Val Cys Gln Lys Leu Gln Lys Ile Asp Leu Arg His Asn
      370      375      380
Glu Ile Tyr Glu Ile Lys Val Asp Thr Phe Gln Gln Leu Leu Ser Leu
      385      390      395      400
Arg Ser Leu Asn Leu Ala Trp Asn Lys Ile Ala Ile Ile His Pro Asn
      405      410      415
Ala Phe Ser Thr Leu Pro Ser Leu Ile Lys Leu Asp Leu Ser Ser Asn
      420      425      430
Leu Leu Ser Ser Phe Pro Ile Thr Gly Leu His Gly Leu Thr His Leu
      435      440      445

```

ES 2 697 674 T3

Lys Leu Thr Gly Asn His Ala Leu Gln Ser Leu Ile Ser Ser Glu Asn  
 450 455 460  
 Phe Pro Glu Leu Lys Val Ile Glu Met Pro Tyr Ala Tyr Gln Cys Cys  
 465 470 475 480  
 Ala Phe Gly Val Cys Glu Asn Ala Tyr Lys Ile Ser Asn Gln Trp Asn  
 485 490 495  
 Lys Gly Asp Asn Ser Ser Met Asp Asp Leu His Lys Lys Asp Ala Gly  
 500 505 510  
 Met Phe Gln Ala Gln Asp Glu Arg Asp Leu Glu Asp Phe Leu Leu Asp  
 515 520 525  
 Phe Glu Glu Asp Leu Lys Ala Leu His Ser Val Gln Cys Ser Pro Ser  
 530 535 540  
 Pro Gly Pro Phe Lys Pro Cys Glu His Leu Leu Asp Gly Trp Leu Ile  
 545 550 555 560  
 Arg Ile Gly Gly Gly His His His His His His  
 565 570

5 <210> 5  
 <211> 22  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> proteína sintetizada artificialmente  
 <400> 5

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp  
 1 5 10 15  
 Leu Pro Gly Ala Arg Cys  
 20

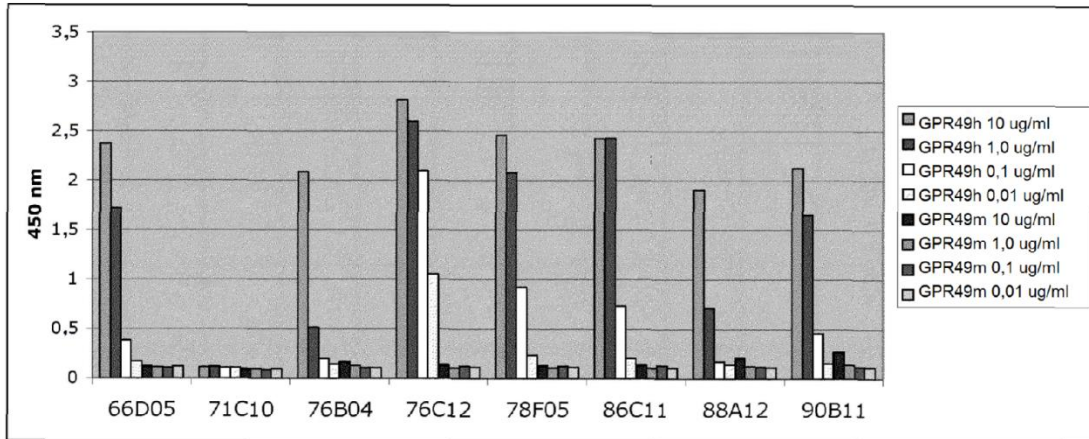
10 <210> 6  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 15 <223> proteína sintetizada artificialmente  
 <400> 6

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

**REIVINDICACIONES**

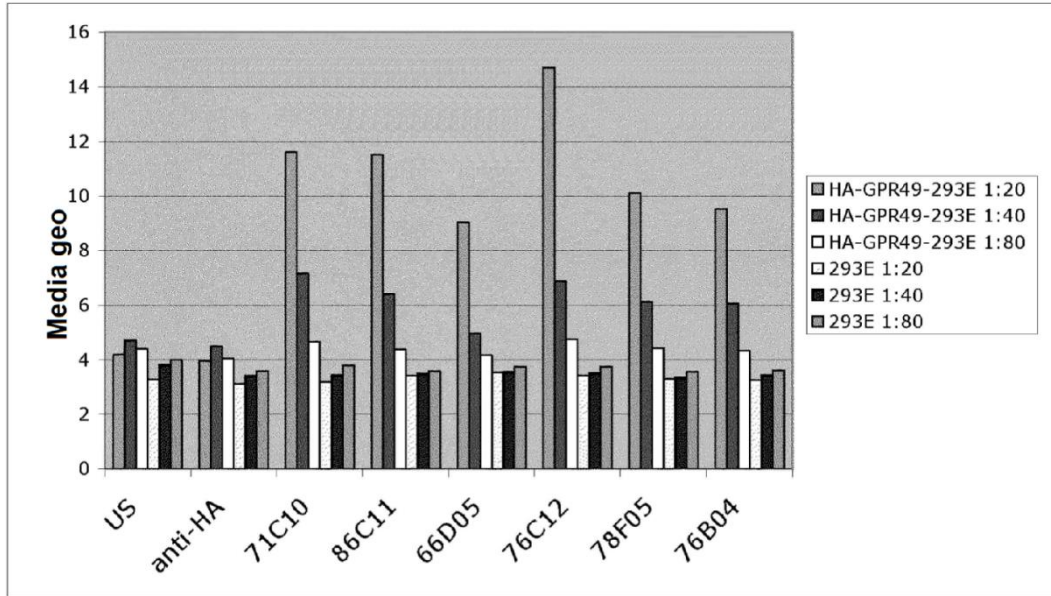
1. Un procedimiento *in vitro* para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, que comprende administrar una cantidad eficaz de un anticuerpo monoclonal que se une a un polipéptido del receptor 49 acoplado de proteínas G (GPR49) con una  $K_d$  menor de  $10 \times 10^{-9}$  M para una célula madre cancerosa, en el que el polipéptido del GPR49 comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la cantidad eficaz es suficiente para bloquear el crecimiento de células madre cancerosas, en el que el crecimiento de células madre cancerosas se mide en un ensayo de esferas tumorales como un crecimiento de una célula madre de cáncer de colon primario en condiciones *in vitro* libres de suero y de bajo anclaje, comprendiendo el ensayo de esferas tumorales las fases de células tumorales de colon único vivo procedentes de xenoinjertos de tumor de colon primario o de biopsias de pacientes recientes que se clasifican y se colocan en placas entre 1-1000 células por pocillo en placas de fijación ultra bajas de 96 pocillos, manteniéndose las células en medio de células madre cancerosas durante 3 semanas, y realizándose intercambio de medio nuevo cada 3-4 días.

**Fig. 1**

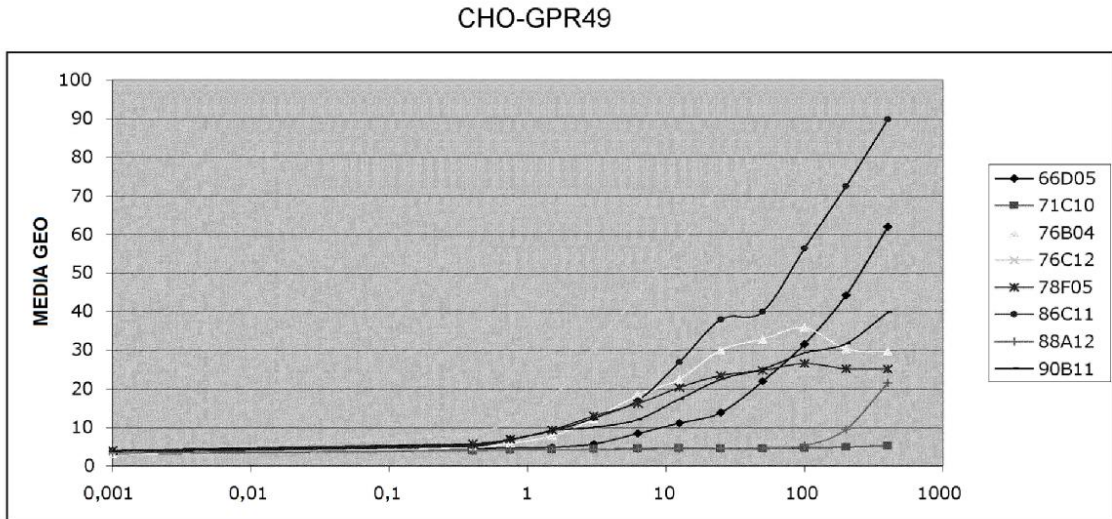




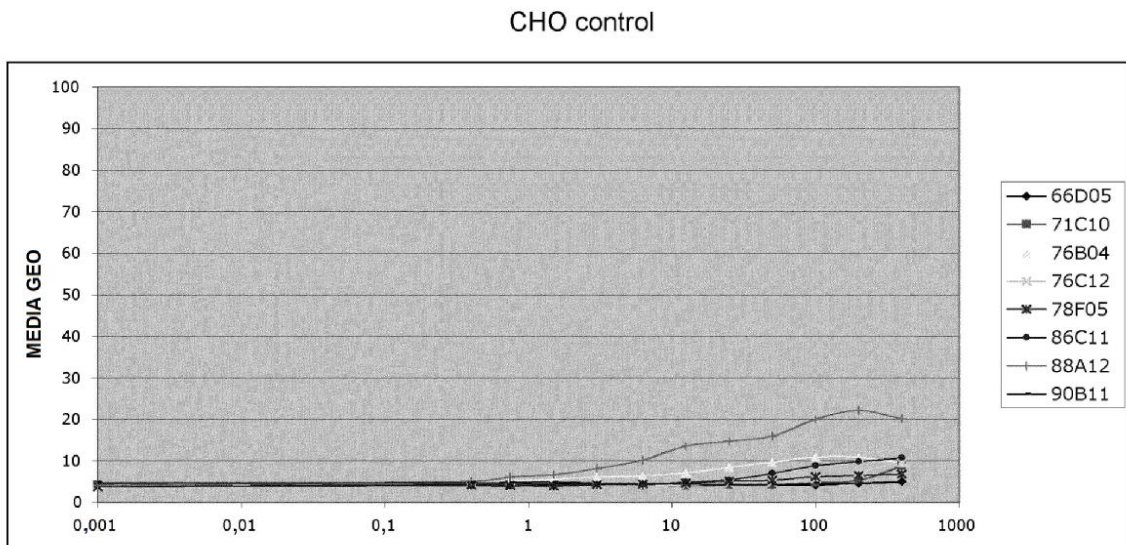
**Fig. 2**



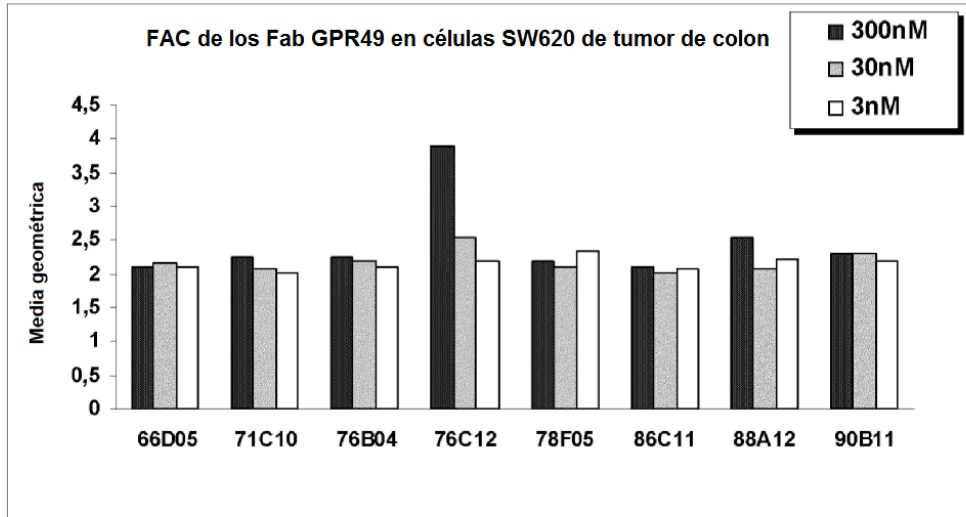
**Fig. 3A**



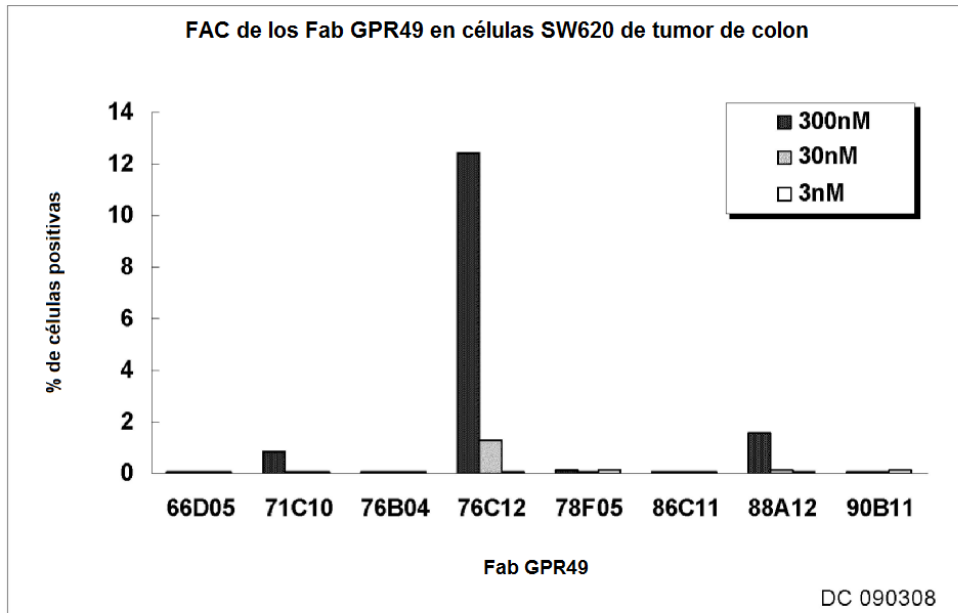
**Fig. 3B**



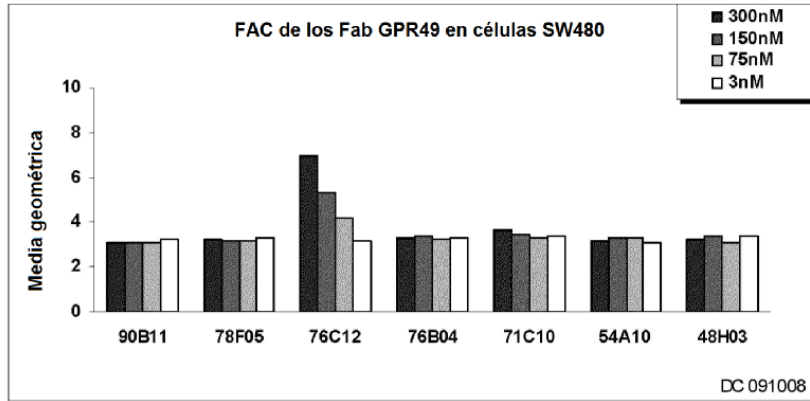
**Fig. 4A**



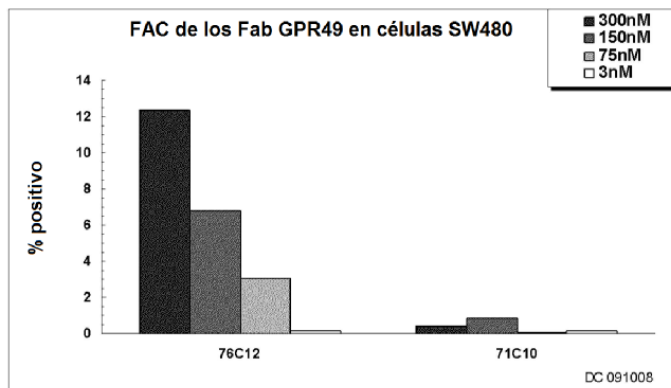
**Fig. 4B**



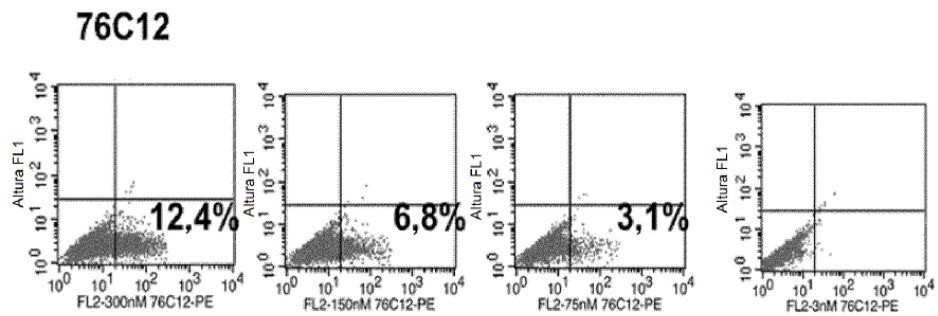
**Fig. 5A**



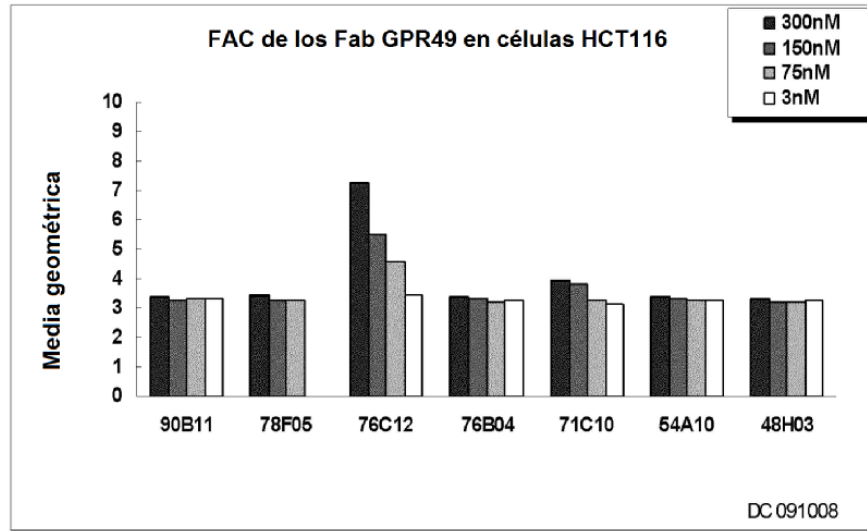
**Fig. 5B**



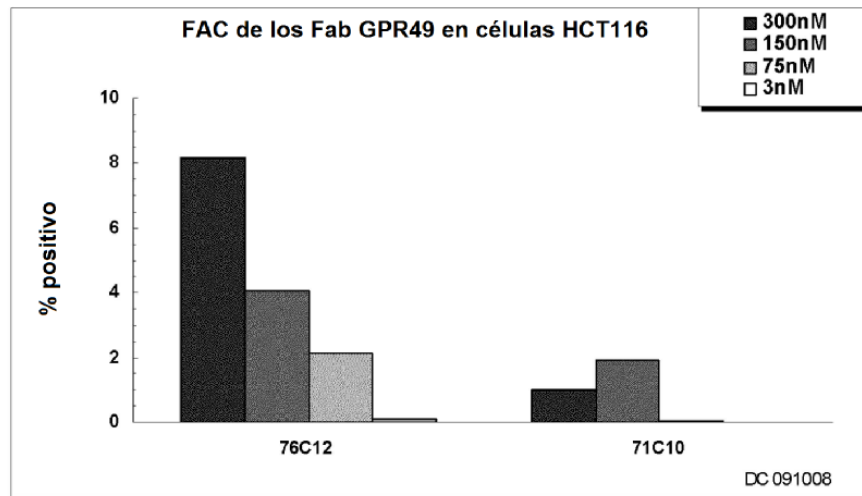
**Fig. 5C**



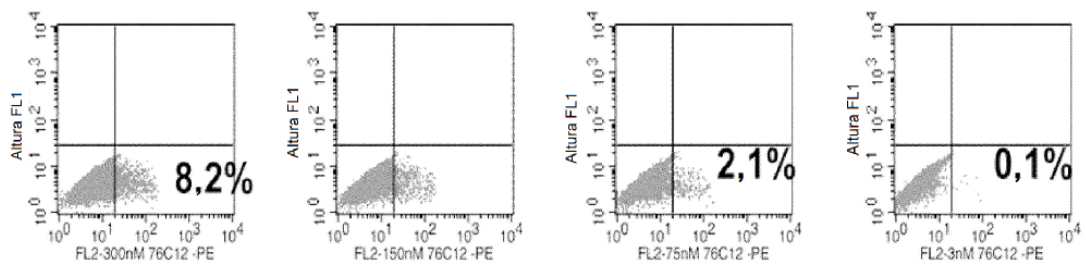
**Fig. 6A**



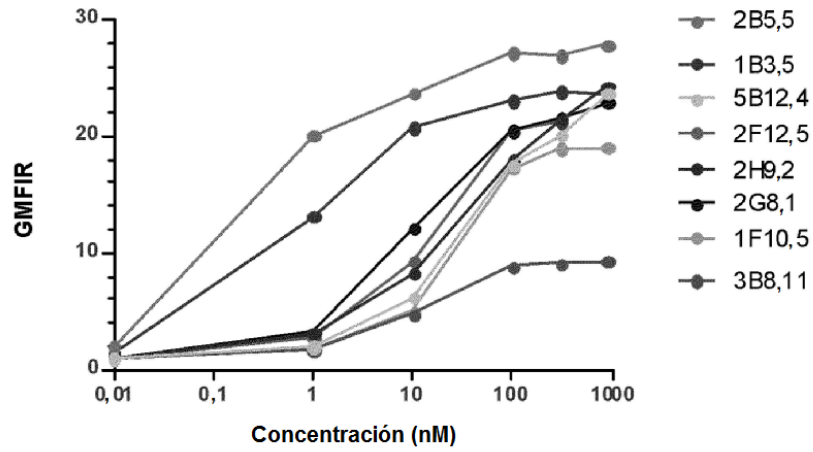
**Fig. 6B**



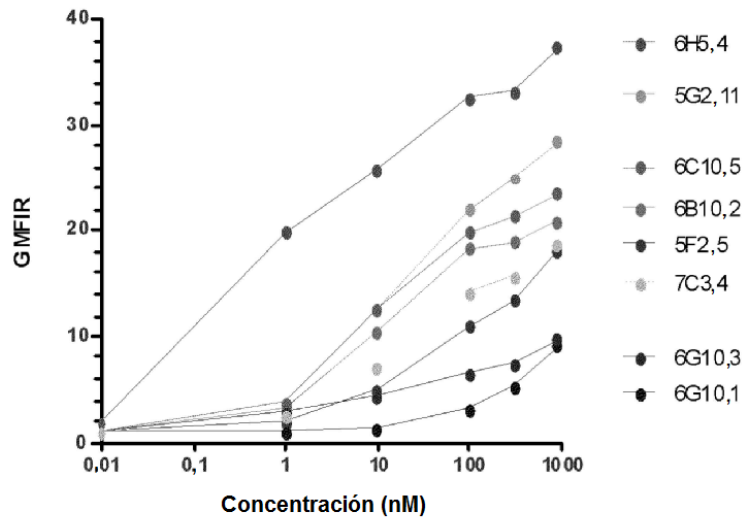
**Fig. 6C**



**Fig. 7A**

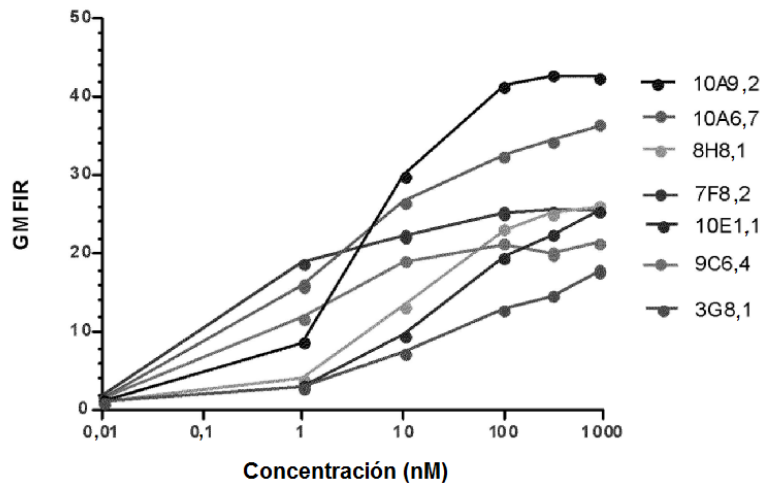


**Fig. 7B**

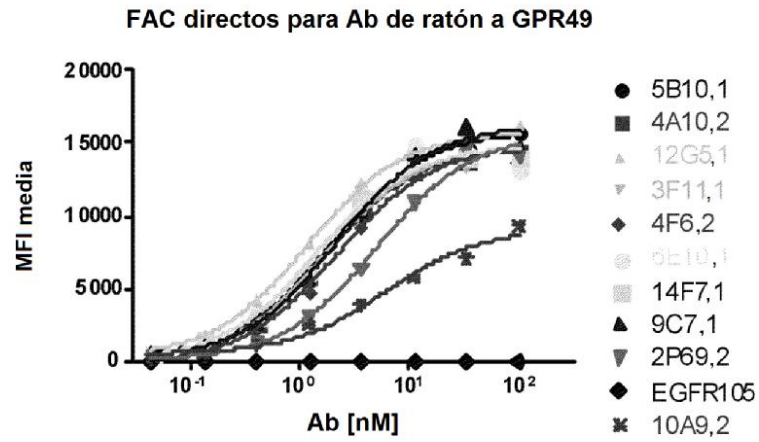


**Fig. 7C**

Unión de Abm GPR49 mu a células CHO GPR49 flag his (50 nM)



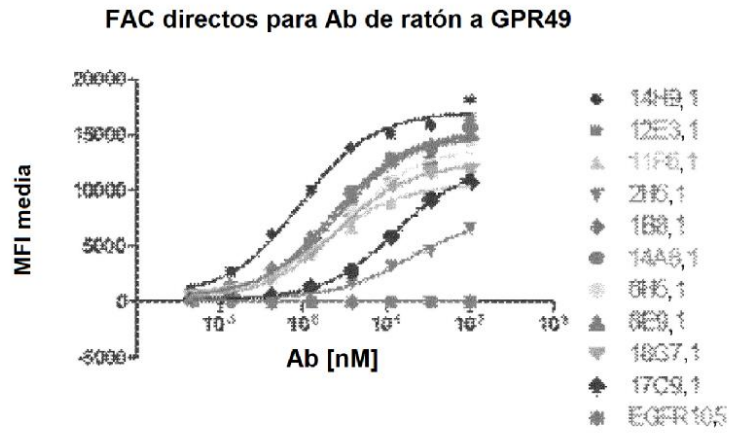
**Fig. 8A**



**Fig. 8B**

	5B10,1	4A10,2	12G5,1	3F11,1	4F6,2	6E10,1	14F7,1	9C7,1	2P69,2	EGFR105	10A9,2
EC50	1,941	1,716	1,210	1,750	2,206	1,322	1,476	2,205	5,116	0,2681	6,218

**Fig. 8C**



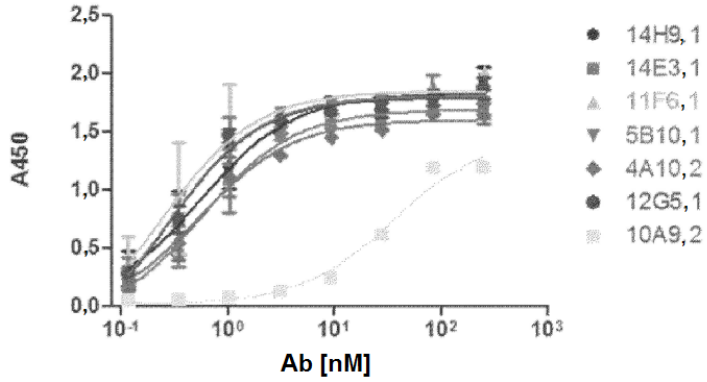
**Fig. 8D**

	14H9,1	12E3,1	11F6,1	2H5,1	1B8,1	14A8,1	6H5,1	8E9,1	18G7,1	17C9,1
EC50	0,9161	2,632	1,853	17,48	2,239	2,143	2,991	2,170	2,460	12,46



**Fig. 9A**

ELISA directo para Ab de ratón de 2ª generación a GPR49

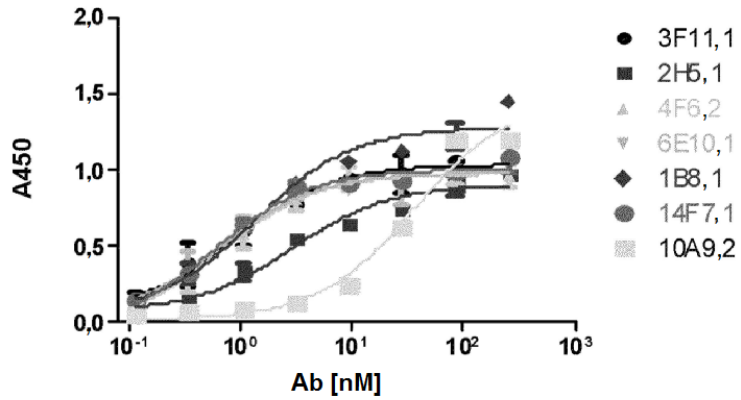


**Fig. 9B**

	14H9,1	14E3,1	11F6,1	5B10,1	4A10,2	12G5,1	10A9,2
EC50	0,5523	0,5587	0,2429	0,2737	0,5311	0,2565	35,22

**Fig. 9C**

ELISA directo para Ab de ratón de 2ª generación a GPR49



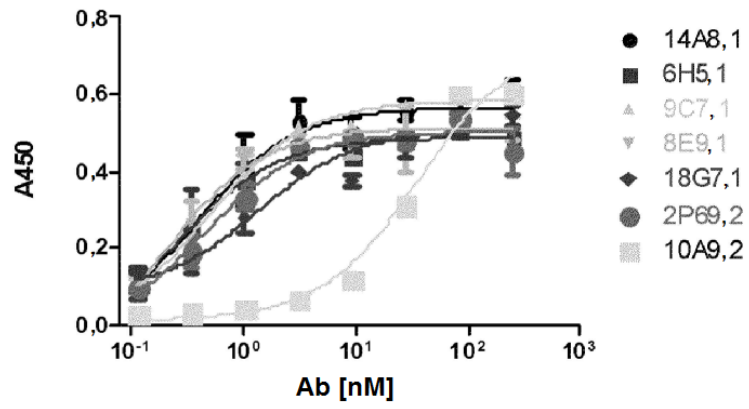
**Fig. 9D**

	3F11,1	2H5,1	4F6,2	6E10,1	1B8,1	14F7,1	10A9,2
EC50	0,8837	2,866	0,6506	0,6577	1,335	0,5695	35,22



**Fig. 9E**

ELISA directo para Ab de ratón de 2ª generación a GPR49

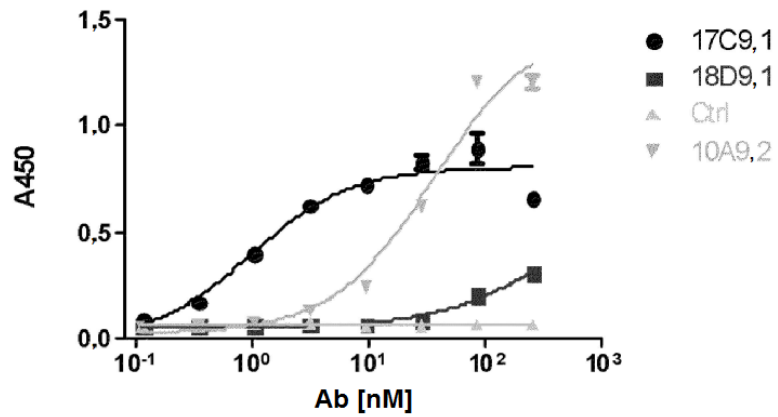


**Fig. 9F**

	14A8,1	6H5,1	9C7,1	8E9,1	18G7,1	2P69,2	10A9,2
EC50	0,3792	0,2844	0,4986	0,2036	1,352	0,4662	35,22

**Fig. 9G**

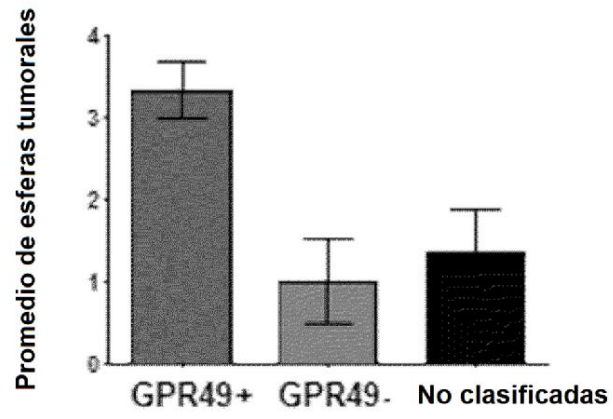
ELISA directo para Ab de ratón de 2ª generación a GPR49



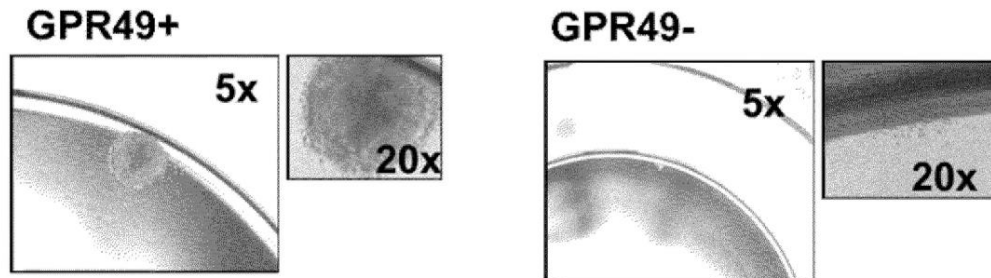
**Fig. 9H**

	17C9,1	18D9,1	Ctrl	10A9,2
EC50	0,9520	225,4	1579	35,22

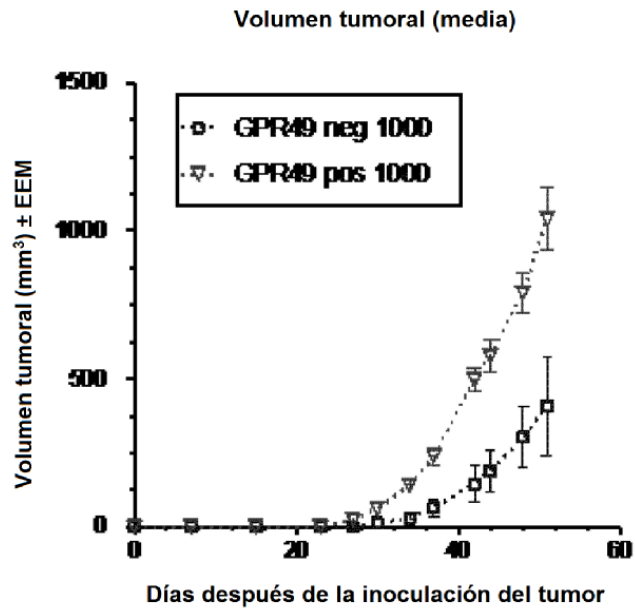
**Fig. 10A**



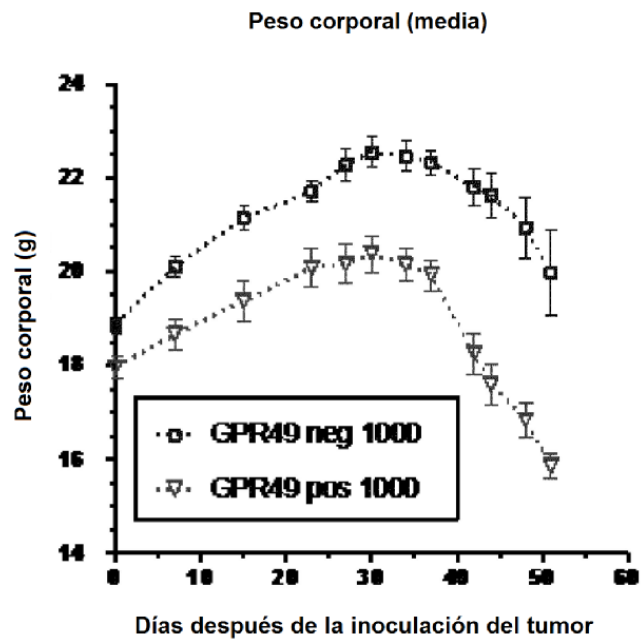
**Fig. 10B**



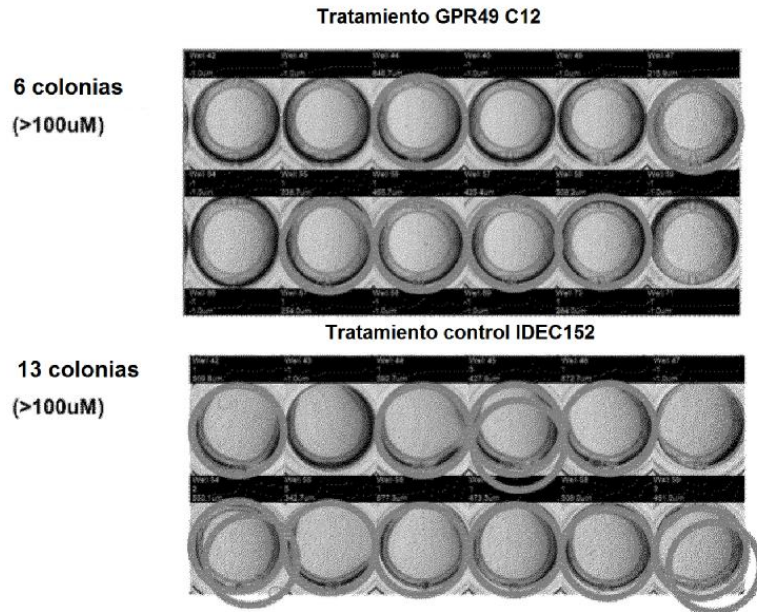
**Fig. 11A**



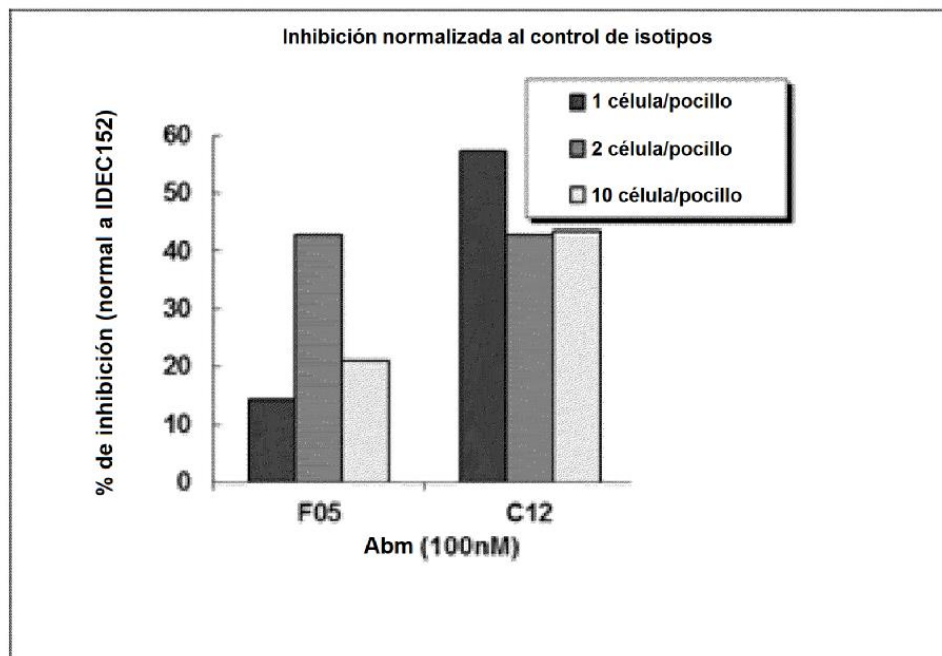
**Fig. 11B**



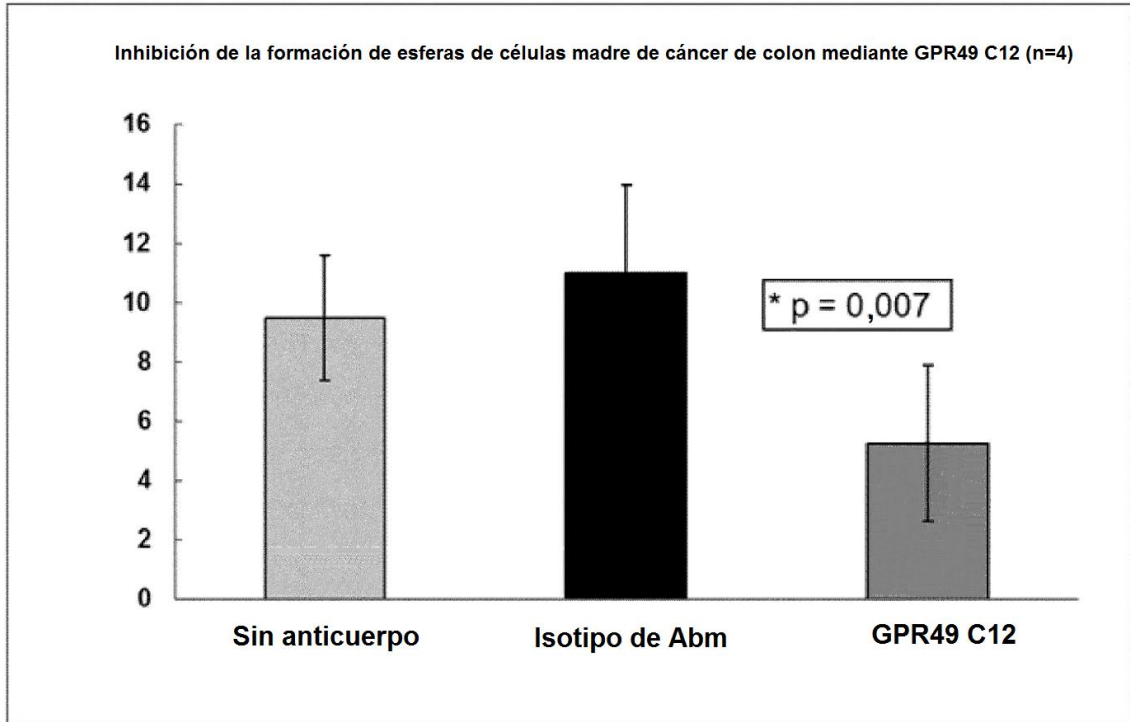
**Fig. 12A**



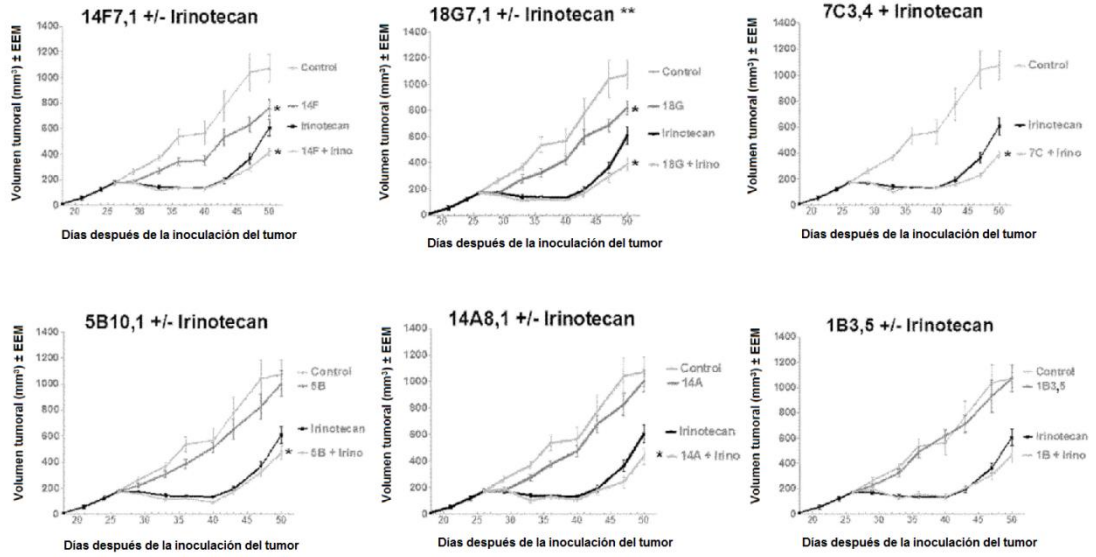
**Fig. 12B**



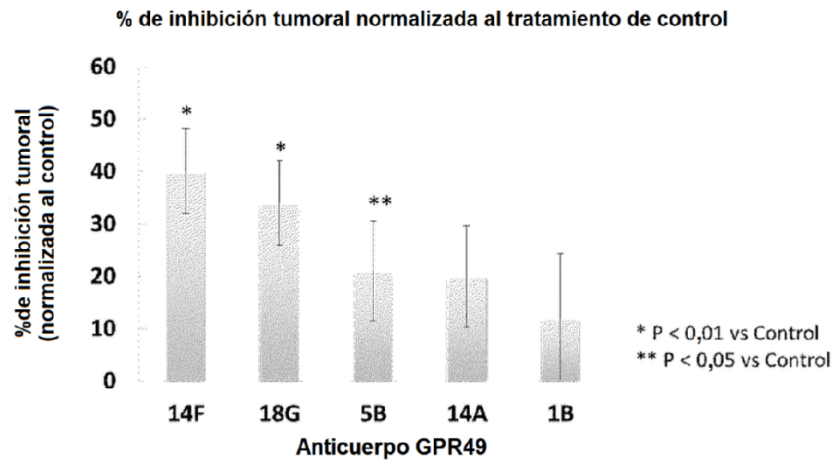
**Fig. 13**



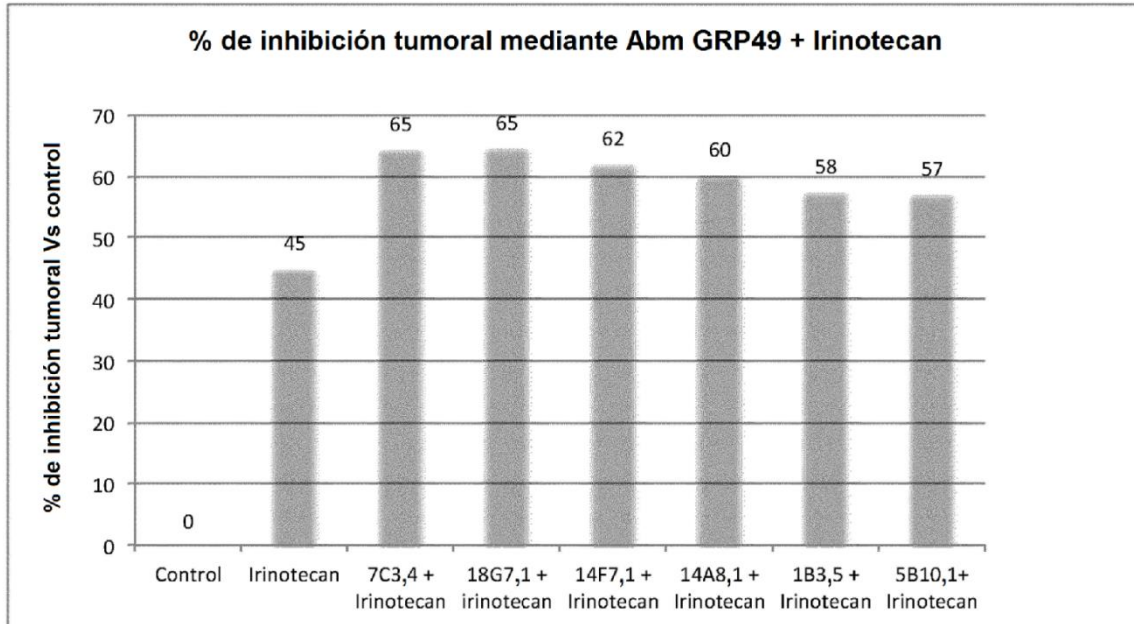
**Fig. 14**



**Fig. 15**

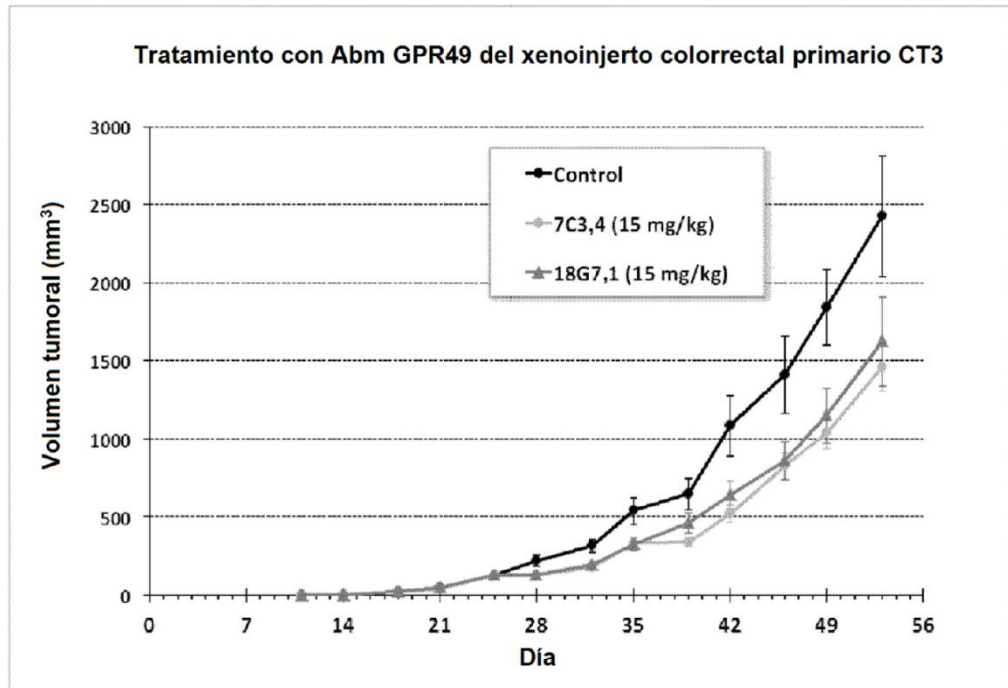


**Fig. 16**

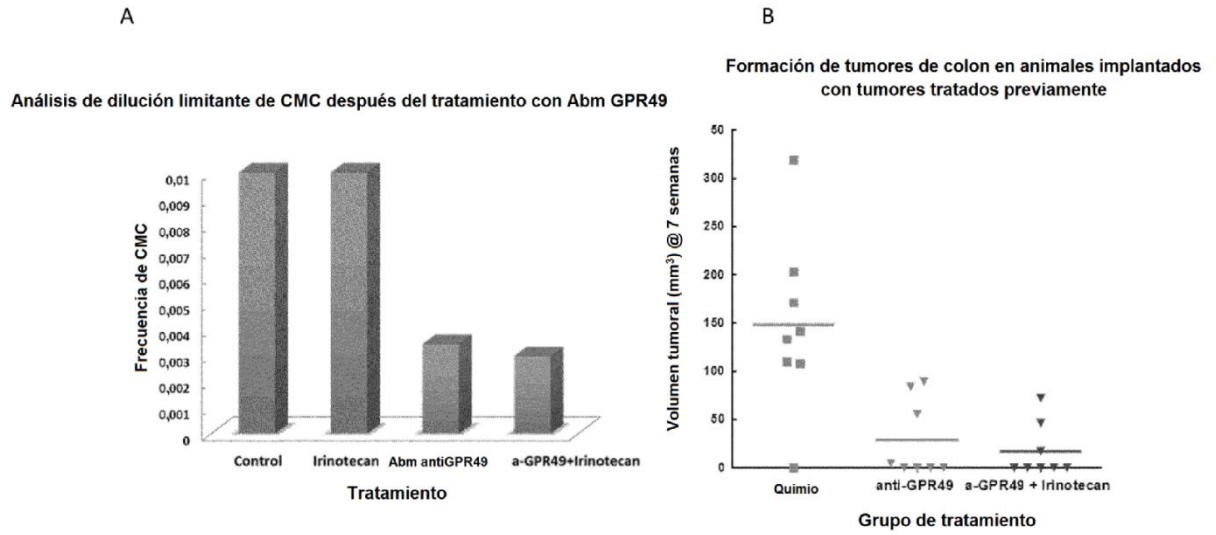




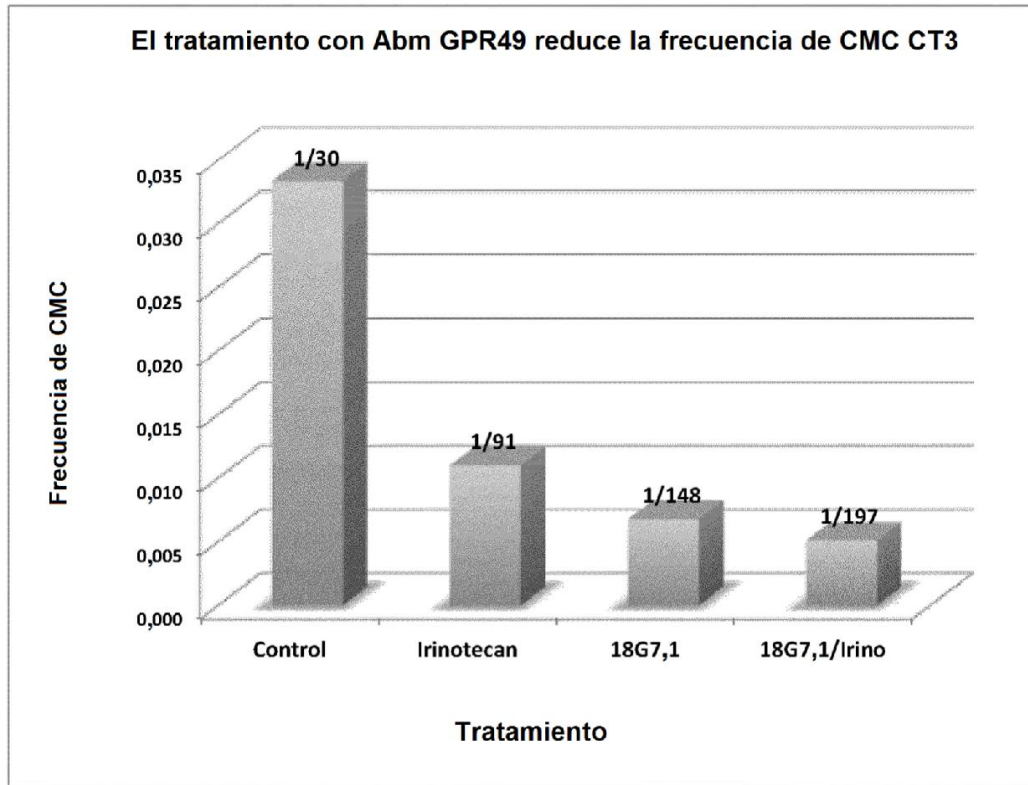
**Fig. 17**



**Fig. 18**



**Fig. 19**



**Fig. 20**

**El tratamiento con anticuerpos GPR49 previene el crecimiento del cáncer de colon mutante K-Ras**

