

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 978 126**

51 Int. Cl.:

C12N 15/02	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	
A61P 35/00	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	
C07K 16/32	(2006.01)	
C12N 1/15	(2006.01)	
C12N 1/19	(2006.01)	
C12N 1/20	(2006.01)	
C12N 5/10	(2006.01)	
C12P 21/08	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.09.2016 PCT/JP2016/078067**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **30.03.2017 WO17051888**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.09.2016 E 16848676 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3354729**

54 Título: **Anticuerpo anti-GARP**

30 Prioridad:

24.09.2015 JP 2015187488

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.09.2024

73 Titular/es:

**DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (100.0%)
3-5-1 Nihonbashi-honcho, Chuo-ku
Tokyo 103-8426, JP**

72 Inventor/es:

**SATOH, KAZUKI;
HIRAHARA, KAZUKI;
WATANABE, ICHIRO y
AMANO, MASATO**

74 Agente/Representante:

BALLESTER INTELLECTUAL PROPERTY S.L.P.U.

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 978 126 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-GARP

Campo técnico

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un anticuerpo que se une a GARP y que es útil como un agente terapéutico para un tumor y a un método para tratar un tumor usando el anticuerpo mencionado anteriormente.

Antecedentes de la técnica

10 **[0002]** Las células T reguladoras (Treg) son las principales células causantes que inducen tolerancia inmunitaria que se observa en el área tumoral de los pacientes con cáncer. Es decir, en los pacientes con cáncer, los grupos de células inmunitarias que trabajan intrínsecamente para matar los tumores pasan a un estado de supresión inmunitaria por la Treg activada en el tumor, y esto conlleva a la progresión maligna del tumor [Bibliografía no de patente 1].

15 **[0003]** La glicoproteína A predominante en repeticiones (GARP) es una proteína con una estructura transmembrana de paso único [Bibliografía no de patente 2] y esta proteína está expresada en la superficie celular de la Treg activada y forma un compuesto con el TGF- β latente (un precursor del TGF- β que es una molécula importante para inducir la tolerancia inmunitaria) [Bibliografía no de patente 3].

20 **[0004]** Como resultado de la interacción célula-célula entre las Treg y las células objetivo a las que la Treg induce inmunosupresión, la TGF- β se madura a partir de la TGF- β latente mediante GARP en la superficie celular de la Treg y se segrega a partir de la Treg, y las señales inmunosupresoras de TGF- β se transmiten directamente a las células objetivo [Bibliografía no de patente 4, 5]. Se ha demostrado que la GARP unida a la membrana expresada en la superficie celular es necesaria para dicha maduración de TGF- β [Bibliografía no de patente 5]. Por otro lado, también se ha demostrado que la GARP soluble que carece de una región transmembrana suprime la proliferación de las células T CD4 positivas cuando se añade directamente al cultivo celular [Bibliografía no de patente 6]. Por
25 consiguiente, no se puede descartar que exista un mecanismo inmunosupresor de GARP que no requiera de la maduración de TGF- β en la membrana celular.

30 **[0005]** La GARP no está expresada solamente por las Treg de la sangre periférica cuando se activan, sino también en un entorno clínico mediante las células T que se infiltran en tumores en zonas tumorales de pacientes con cáncer [Bibliografía no de patente 7], por las Treg existentes en la ascitis [Bibliografía no de patente 8] y también por las Treg que circulan en la sangre periférica de los pacientes con cáncer [Bibliografía no de patente 9].

35 **[0006]** En un informe que investiga el efecto de inhibición de la expresión de GARP en la función de la Treg, GARP que era el objetivo de ARNsi, inhibió la función inmunosupresora de las Treg en las respuestas proliferativas de las células T auxiliares, pero dicho efecto inhibitorio fue parcial [Bibliografía no de patente 10].

40 **[0007]** En otro informe, los anticuerpos anti-GARP (MHG-8 y LHG-10) que se habían obtenido por sus habilidades para inhibir la maduración de TGF- β inhibieron la función supresora de las células A1, que es una línea celular de Treg [Bibliografía no de patente 11] establecida a partir de los pacientes con hemocromatosis en las respuestas proliferativas de las células T auxiliares [Bibliografía de patente 1 y Bibliografía no de patente 12]. Sin embargo, no se sabe si los anticuerpos mencionados anteriormente exhiben de manera efectiva dichos efectos inhibitorios o no en las Treg en un microentorno tumoral y, hasta la fecha, no se ha comunicado ningún anticuerpo anti-GARP que tenga dichos efectos. También se conoce un anticuerpo que reconoce tanto GARP como TGF- β [Bibliografía de
45 patente 2].

[0008] Se ha demostrado que la presencia excesiva y la activación de las Treg en pacientes que tienen malaria e infección por el VIH exhibe una correlación con el estado de la enfermedad [Bibliografía no de patente 13 y 14] y que la eliminación de las Treg dio lugar a la remisión del estado de la enfermedad en modelos murinos para las enfermedades [Bibliografía no de patente 15 y 16]

Lista de referencias

Bibliografía de patente

[0009]

- 5 Bibliografía de patente 1: WO2015/015003
Bibliografía de patente 2: WO2016/125017

Bibliografía no de patente

[0010]

- 10 Bibliografía no de patente: 1: Int J Cancer. 15 de agosto de 2010; 127(4): 759-67.
Bibliografía no de patente: 2: PLoS One. 2008; 3(7): e2705.
Bibliografía no de patente: 3: Proc Natl Acad Sci USA. 2009; 106(32): 13445-50.
Bibliografía no de patente: 4: Eur J Immunol. 2009; 39(12): 3315-22.
Bibliografía no de patente: 5: Mol Biol Cell. 2012; 23(6): 1129-39.
Bibliografía no de patente: 6: Blood. 2013; 122(7): 1182-91.
Bibliografía no de patente: 7: Eur J Immunol. Julio de 2012; 42(7): 1876-85.
15 Bibliografía no de patente: 8: Clin Immunol. Octubre de 2013; 149(1): 97-110.
Bibliografía no de patente: 9: Cancer Res. 2013; 73: 2435.
Bibliografía no de patente: 10: Proc Natl Acad Sci USA. 11 de agosto de 2009; 106(32): 13445-50.
Bibliografía no de patente: 11: Eur J Immunol. 2009; 39(12): 869-82.
Bibliografía no de patente: 12: Sci Transl Med. 22 de abril de 2015; 7(284).
20 Bibliografía no de patente: 13: PLoS One. 30 de abril de 2008; 3(4): e2027.
Bibliografía no de patente: 14: Clin Exp Immunol. Junio de 2014; 176(3): 401-9.
Bibliografía no de patente: 15: J Immunol. 1 de junio de 2012; 188(11): 5467-77.
Bibliografía no de patente: 16: PLoS Pathog. 2013; 9(12): e1003798.

Resumen de la invención

25 Problema técnico

[0011] Es un objeto de la presente invención proporcionar un anticuerpo que inhibe la función de las Treg en un tumor y se usa de este modo como un producto farmacéutico que tiene efectos terapéuticos, un método para tratar un tumor que usa el anticuerpo mencionado anteriormente y similares.

Solución al problema

- 30 [0012] Los presentes inventores han llevado a cabo estudios intensivos dirigidos a conseguir el objeto mencionado anteriormente. Como resultado, los inventores han encontrado un anticuerpo que se une específicamente a GARP y que exhibe una actividad de inhibición de la función de las Treg a través de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, completando de este modo la presente invención. Específicamente, la presente invención incluye los siguientes aspectos de la invención.

- 35 (1) Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

- (a) unión específica a la glicoproteína A predominante en repeticiones (GARP, por sus siglas en inglés);
- (b) que tiene una actividad inhibidora de la función inmunosupresora de las células T reguladoras;
- (c) que tiene actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos (ADCC, por sus siglas en inglés); y
- (d) que tiene actividad antitumoral *in vivo*,

- 40 y que tiene:

- (a) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37;
- 45 (b) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una región variable de cadena

ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 39; o

- 5 (c) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

- 10 (2) El anticuerpo de acuerdo con la (1) anterior, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37.

- (3) El anticuerpo de acuerdo con la (1) anterior, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 39.

- 15 (4) El anticuerpo de acuerdo con la (1) anterior, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

- 20 (5) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores de la (1) a la (4), donde el tumor es un cáncer.
(6) El anticuerpo de acuerdo con la (5) anterior, donde el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer en la sangre.

(7) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las de la (1) a la (6) anteriores, que tiene:

- 25 (a) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 37,
(b) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 39 o
30 (c) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 469 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

- 35 (8) El anticuerpo de acuerdo con la anterior (7), que tiene: una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 37.

- 40 (9) El anticuerpo de acuerdo con la (7) anterior, que tiene: una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 39.

- 45 (10) El anticuerpo de acuerdo con la (7) anterior, que tiene: una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 469 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

(11) Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la (1) a la (10) anteriores.

(12) El polinucleótido de acuerdo con la (11) anterior, que tiene:

- 50 (a) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 que se muestra en SEQ ID NO: 32, un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 36,
(b) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 que se muestra en SEQ ID NO: 34, un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 38, o
55 (c) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 417 que se muestra en SEQ ID NO: 40, y un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 42.

- 60 (13) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la (11) o de la (12) anteriores, que tiene:

- (a) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 que se muestra en SEQ ID NO: 32, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 36,
- 5 (b) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 que se muestra en SEQ ID NO: 34, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 38, o
- 10 (c) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1407 que se muestra en SEQ ID NO: 40, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 42.
- (14) Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de la (11) a la (13) anteriores.
- 15 (15) Células huésped transformadas con el vector de expresión de acuerdo con la (14) anterior.
- (16) Un método de producción de un anticuerpo de interés o un fragmento del mismo, que comprende una etapa de cultivo de las células huésped de acuerdo con la (15) anterior y una etapa de recogida de un anticuerpo de interés a partir del cultivo obtenido por la etapa mencionada anteriormente.
- 20 (17) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las anteriores de la (1) a la (10), que comprende una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación N-ligada, glicosilación O-ligada, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina al N-terminal, amidación de un residuo de prolina, y una cadena pesada que comprende una delección de uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo.
- (18) El anticuerpo de acuerdo con la (17) anterior, donde se eliminan uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo.
- 25 (19) El anticuerpo de acuerdo con la (18) anterior, donde se elimina un aminoácido en cada uno de los extremos carboxilos de ambas de las cadenas pesadas del mismo.
- (20) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la (17) a la (19) anteriores, donde un residuo de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo está además amidado.
- 30 (21) El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de la (1) a la (10) y de la (17) a la (20) anteriores, donde la modificación de la cadena glucídica se regula para mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
- (22) Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con de la (1) a la (10) y de la (17) a la (21) anteriores.
- (23) La composición farmacéutica de acuerdo con la (22) anterior, que es para su uso en terapia tumoral.
- 35 (24) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la (23) anterior, donde el tumor es un cáncer.
- (25) La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la anterior (24), donde el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer en la sangre.
- 40 Efectos ventajosos de la invención

[0013] De acuerdo con la presente invención, se puede obtener un agente terapéutico para el cáncer que comprende un anticuerpo que se une a GARP y que tiene actividad antitumoral causada por la inhibición mediada por ADCC de las Treg. Además, la presencia excesiva y la activación de las Treg en pacientes que tienen malaria e infección por el VIH exhibe una correlación con el estado de la enfermedad y la eliminación de las Treg induce la remisión del estado de la enfermedad en modelos murinos para las enfermedades. En consecuencia, se puede esperar que la inhibición efectiva de la función de las Treg tenga también efectos terapéuticos en enfermedades infecciosas refractarias, tales como aquellas causadas por la malaria y el VIH.

Breve descripción de los dibujos

[0014]

- 50 [Figura 1] La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de GARP.
- [Figura 2] La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de una cadena pesada del anticuerpo 105F.
- [Figura 3] La Figura 3 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 3) de una cadena ligera del anticuerpo 105F.
- 55 [Figura 4] La Figura 4 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de una cadena pesada del anticuerpo 110F.
- [Figura 5] La Figura 5 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de una cadena ligera del anticuerpo 110F.

[Figura 6] La Figura 6 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 6) de una cadena pesada del anticuerpo 105F.

[Figura 7] La Figura 7 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 7) de una cadena pesada del anticuerpo 105F.

5 [Figura 8] La Figura 8 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 8) de una cadena pesada del anticuerpo 110F.

[Figura 9] La Figura 9 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 9) de una cadena pesada del anticuerpo 110F.

10 [Figura 10] La Figura 10 muestra la unión de los anticuerpos a GARP. El anticuerpo 105F y el anticuerpo 110F exhibieron la unión de los mismos a GARP de acuerdo con el método ELISA.

[Figura 11] La Figura 11 muestra la unión específica de los anticuerpos a GARP. El anticuerpo 105F no se unió a las células HEK293T, en las cuales se había introducido un vector vacío, y exhibió la unión del mismo a las células HEK293T, en las que se había expresado GARP de forma transitoria.

15 [Figura 12] La Figura 12 muestra la unión específica de un anticuerpo a GARP. El anticuerpo 105F exhibió una actividad de unión a las células L428 que expresan de forma endógena GARP.

[Figura 13] La Figura 13 muestra la unión específica de los anticuerpos a GARP. El anticuerpo 105F exhibió una actividad de unión a las Treg activadas.

[Figura 14] La Figura 14 muestra la actividad de ADCC de los anticuerpos. Cuando el objetivo fueron células L428 que expresaban de forma endógena GARP, se observó un aumento de la actividad ADCC en función de la concentración del anticuerpo 105F.

20 [Figura 15] La Figura 15 muestra la actividad inhibidora de un anticuerpo a la función de las Treg. El anticuerpo 105F (50 µg/mL) inhibió la función supresora de la proliferación de las Treg contra las células T auxiliares.

[Figura 16] La Figura 16 muestra la actividad inhibidora de un anticuerpo de la función de las Treg. El anticuerpo 105F (10 µg/mL) inhibió la función supresora de la proliferación de las Treg contra las células T auxiliares. Por otro lado, los anticuerpos MHG-8 y LHG-10 no exhibieron el efecto en la función supresora de la proliferación de las Treg contra las células T auxiliares.

25 [Figura 17] La Figura 17 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de una cadena pesada de anticuerpos c151D.

30 [Figura 18] La Figura 18 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) de una cadena ligera de anticuerpos c151D.

[Figura 19] La Figura 19 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de una cadena pesada de anticuerpos c198D.

35 [Figura 20] La Figura 20 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 31) de una cadena ligera de anticuerpos c198D.

[Figura 21] La Figura 21 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 33) de una cadena pesada h151D-H1.

[Figura 22] La Figura 22 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) de una cadena ligera h151D-L1.

40 [Figura 23] La Figura 23 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) de una cadena pesada h151D-H4.

[Figura 24] La Figura 24 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de una cadena ligera h151D-L4.

45 [Figura 25] La Figura 25 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) de una cadena pesada h198D-H3.

[Figura 26] La Figura 26 muestra la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) de una cadena ligera h198D-L4.

[Figura 27] La Figura 27 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 24) de una cadena pesada de anticuerpos c151D.

50 [Figura 28] La Figura 28 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 26) de una cadena ligera de anticuerpos c151D.

[Figura 29] La Figura 29 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 28) de una cadena pesada de anticuerpos c198D.

55 [Figura 30] La Figura 30 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 30) de una cadena ligera de anticuerpos c198D.

[Figura 31] La Figura 31 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 32) de una cadena pesada de anticuerpos h151D- H1.

[Figura 32] La Figura 32 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) de una cadena pesada de anticuerpos h151D- L1.

60 [Figura 33] La Figura 33 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 34) de una cadena pesada h151D- H4.

[Figura 34] La Figura 34 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 38) de una cadena ligera h151D-L4.

65 [Figura 35] La Figura 35 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 40) de una cadena pesada h198D- H3.

[Figura 36] La Figura 36 muestra la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 42) de una cadena ligera h198D-L4.

[Figura 37] La Figura 37 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a las células que expresan GARP. h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron una actividad de unión específica a GARP.

[Figura 38] La Figura 38 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a las células que coexpresan GARP-TGF β 1. Los anticuerpos individuales 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se unieron tanto a GARP como a un mutante de GARP, que se coexpresaron con TGF β 1 y estos anticuerpos exhibieron una actividad de unión a una región diferente en GARP del caso de los anticuerpos conocidos MHG8 y LHG10.

[Figura 39] La Figura 39 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a las células L428. Los anticuerpos individuales h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron una actividad de unión a la GARP expresada de forma endógena.

[Figura 40] La Figura 40 muestra la actividad de unión de cada anticuerpo a las Treg. Los anticuerpos individuales h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron una actividad de unión a las Treg positivas para FoxP3.

[Figura 41] La Figura 41 muestra la actividad de ADCC de cada anticuerpo. Los anticuerpos individuales h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron una actividad de ADCC.

[Figura 42] La Figura 42 muestra la actividad inhibidora de cada anticuerpo de la función de las Treg. Los anticuerpos individuales h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron la actividad inhibidora de la función de las Treg.

[Figura 43] La Figura 43 muestra la actividad supresora de las Treg en la actividad de lisis de las células objetivo de CTL.

[Figura 44] La Figura 44 muestra un aumento de la actividad antitumoral de cada anticuerpo. Los anticuerpos individuales 105F h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 inhibieron la función supresora de las Treg en la actividad de lisis las células de CTL.

[Figura 45] La Figura 45 muestra la actividad antitumoral *in vivo* de cada anticuerpo. Los anticuerpos individuales 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron una actividad antitumoral en modelos *in vivo*.

Descripción detallada

[0015] En la presente descripción, el término "cáncer" se usa para tener el mismo significado que el del término "tumor".

[0016] En la presente descripción, el término "gen" se usa para incluir, no solamente el ADN, sino también su ARNm y ADNc y el ARNc del mismo.

[0017] En la presente descripción, el término "polinucleótido" se usa para tener el mismo significado que el de un ácido nucleico e incluye el ADN, el ARN, una sonda, un oligonucleótido y un cebador.

[0018] En la presente descripción, el término "polipéptido" se usa de manera que no se distinga del término "proteína".

[0019] En la presente descripción, el término "célula" incluye células en un animal individual y células cultivadas.

[0020] En la presente descripción, el término "GARP" se usa para tener el mismo significado que el de la proteína GARP.

[0021] En la presente descripción, el término "citotoxicidad" se usa para referirse a que se provoca un cambio patológico en las células de cualquier forma dada. No solamente se refiere a un trauma directo, sino también se refiere a todos los tipos de daño funcional o estructural provocado a las células, tal como una escisión del ADN, la formación de un dímero de bases, escisión cromosómica, daños en el aparato mitótico celular y una reducción de las actividades de diversos tipos de enzimas.

[0022] En la presente descripción, el término "actividad citotóxica" se usa para referirse a una actividad que provoca la citotoxicidad descrita anteriormente.

[0023] En la presente descripción, el término "citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" se usa para referirse a una "actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos (ADCC)", y esta actividad se refiere al efecto o a la actividad de dañar las células objetivo, tales como células tumorales, por células NK mediadas por un anticuerpo.

[0024] En la presente descripción, el término "epítipo" se usa para referirse al péptido parcial o a la estructura parcial tridimensional de GARP a la que se une un anticuerpo anti-GARP específico. Dicho epítipo, que es un

péptido parcial de la GARP descrita anteriormente, puede estar determinado por un método bien conocido por un experto en la materia, tal como un inmunoensayo, por ejemplo, mediante el siguiente método. Primero, se producen diversas estructuras parciales de un antígeno. En cuanto a la producción de dichas estructuras parciales, se puede aplicar una técnica de síntesis de oligopéptidos conocida. Por ejemplo, se produce una serie de péptidos, en los que un antígeno ha sido sucesivamente truncado en una longitud apropiada a partir del C-terminal o N-terminal del mismo, mediante una técnica de recombinación genética bien conocida para un experto en la materia y, posteriormente, se estudia la reactividad de un anticuerpo a dichos polipéptidos y se determinan de forma aproximada los sitios de reconocimiento. Posteriormente, se sintetizan otros péptidos más cortos y, a continuación, se estudia la reactividad de los mismos a los péptidos mencionados anteriormente para determinar un epítipo. Además, un epítipo, que es una estructura parcial tridimensional de un antígeno que se une a un anticuerpo específico, puede estar determinado por la especificación de los residuos de aminoácidos de un antígeno adyacente al anticuerpo descrito anteriormente mediante un análisis estructural de rayos X.

[0025] En la presente descripción, la frase "anticuerpos que se unen al mismo epítipo" se usa para referirse a diferentes anticuerpos que se unen a un epítipo común. Si un segundo anticuerpo se une a un péptido parcial o a una estructura parcial tridimensional, a la que se une un primer anticuerpo, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo. Además, al confirmar que un segundo anticuerpo compite con un primer anticuerpo para la unión de un primer anticuerpo a un antígeno (es decir, un segundo anticuerpo interfiere en la unión de un primer anticuerpo a un antígeno), puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo, aunque no se haya determinado la secuencia o la estructura específica del epítipo. Asimismo, cuando el primer anticuerpo tiene efectos especiales, tales como actividad antitumoral, se puede esperar que el segundo anticuerpo tenga la misma actividad que el primer anticuerpo. En consecuencia, si un segundo anticuerpo anti-GARP se une a un péptido parcial al que se une un primer anticuerpo anti-GARP, puede determinarse que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo se unen al mismo epítipo de GARP. Además, al confirmar que el segundo anticuerpo anti-GARP compite con el primer anticuerpo anti-GARP para la unión del primer anticuerpo anti-GARP a GARP, se puede determinar que el primer anticuerpo y el segundo anticuerpo son anticuerpos que se unen al mismo epítipo de GARP.

[0026] En la presente descripción, el término "CDR" se usa para referirse a una región que determina la complementariedad. Se sabe que la cadena pesada y la cadena ligera de una molécula de anticuerpo tienen cada una tres CDR. Dicha CDR también se denomina dominio hipervariable y está ubicada en la región variable de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo. Estas regiones tienen una estructura primaria altamente variable y están separadas en tres sitios en la estructura primaria de la cadena de polipéptidos en cada una de la cadena pesada y cadena ligera. En la presente descripción, con respecto a la CDR de un anticuerpo, las CDR de una cadena pesada se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3, respectivamente, del lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada, mientras que las CDR de una cadena ligera se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3, respectivamente, del lado amino terminal de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera. Estos sitios están ubicados cerca el uno del otro en la estructura tridimensional y determinan la especificidad del anticuerpo a un antígeno, al que se une el anticuerpo.

[0027] En la presente descripción, la frase "hibridar bajo condiciones estrictas" se usa para referirse a que la hibridación se lleva a cabo en la solución de hibridación disponible en el mercado ExpressHyb Hybridization Solution (fabricada por Clontech) a 68 °C, o a que la hibridación se lleva a cabo bajo condiciones en las que la hibridación se lleva a cabo usando un filtro inmovilizado con ADN en presencia de 0,7-1,0 M NaCl a 68 °C y, a continuación, se lava el resultante a 68 °C con una concentración de 0,1 a 2 veces de solución de SSC (donde 1 x SSC consiste en 150mM NaCl y 15mM de citrato de sodio) para la identificación o las condiciones equivalentes al mismo.

1. GARP

[0028] La GARP usada en la presente descripción puede purificarse directamente a partir de las células que expresan GARP de un mamífero humano o no humano (por ejemplo, una rata, un ratón, etc.) y, a continuación, puede usarse, o una fracción de una membrana celular de las células mencionadas anteriormente puede prepararse y usarse como la GARP. Como alternativa, la GARP también puede obtenerse sintetizándola *in vitro*, o permitiendo que las células huésped produzcan GARP mediante manipulación genética. De acuerdo con dicha manipulación genética, se puede obtener la proteína GARP, específicamente, incorporando el ADNc de GARP en un vector de expresión capaz de expresar el ADNc de GARP y, a continuación, sintetizando GARP en una solución que comprende enzimas, sustrato y materiales energéticos necesarios para la transcripción y traducción, o transformando las células huésped de otras procariotas o eucariotas para permitirles que expresen GARP.

[0029] Las secuencias de aminoácidos de GARP humana se muestran en SEQ ID NO: 1 en la lista de secuencias. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 1 se muestra en la Figura 1.

[0030] Además, una proteína, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente de GARP y que tiene actividad biológica equivalente a la de la proteína de GARP, también se incluye en GARP.

5

[0031] La GARP humana madura de la que se ha eliminado una secuencia de señal, corresponde a una secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 662 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1.

10

[0032] Además, una proteína, que consiste en una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1, o en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 1 de la que se ha eliminado una secuencia de señal y que tiene una actividad biológica equivalente a la de GARP, también se incluye en GARP. Además, una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos codificada por una variante de empalme transcrita a partir de un locus del gen de GARP humana, o una secuencia de aminoácidos que comprende una sustitución, delección y/o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de aminoácidos mencionada anteriormente, y que tiene una actividad biológica equivalente a la de GARP, también se incluye en GARP.

15

2. Producción de un anticuerpo anti-GARP

20

[0033] Un ejemplo de un anticuerpo contra GARP de la presente descripción pero que no está dentro del alcance literal de las reivindicaciones puede ser un anticuerpo humano anti-GARP. El anticuerpo humano anti-GARP se refiere a un anticuerpo humano que solamente tiene la secuencia genética de un anticuerpo derivado de cromosomas humanos.

25

[0034] El anticuerpo humano anti-GARP puede obtenerse mediante un método que usa un ratón que produce anticuerpos humanos que tiene un fragmento cromosómico humano que comprende genes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo humano (véase Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, pág. 133-143; Kuroiwa, Y. et al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, pág. 3447-3448; Yoshida, H. et al., Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects vol. 10, pág. 69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. y Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999.; Tomizuka, K. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, pág. 722-727; etc.).

30

[0035] Dicho ratón que produce anticuerpos humanos puede producirse específicamente usando un animal modificado genéticamente, los genes loci de la cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulinas endógenas se han interrumpido y, en su lugar, se han introducido los genes loci de la cadena pesada y cadena ligera de inmunoglobulinas humanas usando un vector de cromosoma artificial de levadura (YAC, por sus siglas en inglés) o similares, y produciendo, a continuación, un animal *knockout* o un animal transgénico a partir de dicho animal modificado genéticamente, y, después, criar dichos animales entre sí.

35

[0036] En caso contrario, el anticuerpo humano anti-GARP también puede obtenerse transformando las células eucariotas con ADNc que codifica cada una de la cadena pesada y la cadena ligera de dicho anticuerpo humano o, preferiblemente, con un vector que comprende el ADNc de acuerdo con técnicas de recombinación genética y, después, cultivando las células transformadas que producen un anticuerpo monoclonal humano modificado genéticamente, de manera que el anticuerpo pueda obtenerse a partir del sobrenadante del cultivo. Por ejemplo, como células huésped se pueden usar las células eucariotas y, preferiblemente, células de mamíferos como células CHO, linfocitos o mielomas.

45

[0037] Como alternativa, el anticuerpo también puede obtenerse por un método de obtención de un anticuerpo humano derivado de la presentación en fagos que se ha seleccionado de una biblioteca de anticuerpos humanos (véase Wormstone, I. M. et al., Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002) 43 (7), pág. 2301-2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), pág. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), pág. 427-431; etc.). Por ejemplo, se puede aplicar un método de presentación en fagos que comprende permitir que la región variable de un anticuerpo humano se exprese como un anticuerpo de cadena única (scFv) en la superficie de un fago y, a continuación, seleccionar un fago que se une a un antígeno (Nature Biotechnology (2005), 23, (9), pág. 1105-1116).

50

55

[0038] Al analizar el gen del fago que se ha seleccionado por su habilidad de unión al antígeno, se puede determinar una secuencia de ADN que codifica la región variable de un anticuerpo humano que se une al antígeno. Una vez que se ha determinado la secuencia de ADN de la unión de scFV al antígeno, se permite que una secuencia de ADN de una región constante de un anticuerpo se una al misma para producir un vector de expresión IgG que tiene las secuencias mencionadas anteriormente, y el vector de expresión producido se introduce, después, en las células huésped adecuadas y se permite la expresión en las mismas, obteniendo de este modo un anticuerpo humano (WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172,

60

WO95/01438, WO95/15388, Annu. Rev. Immunol (1994) 12, pág. 433-455, Nature Biotechnology (2005) 23 (9), pág. 1105-1116).

5 [0039] Además, el anticuerpo contra GARP de la presente descripción puede obtenerse inmunizando un animal con GARP o con cualquier otro polipéptido dado seleccionado de la secuencia de aminoácidos de GARP y, después, recogiendo y purificando un anticuerpo producido en un cuerpo vivo del mismo. La especie del organismo de la GARP usada como un antígeno no se limita a humanos y, por consiguiente, un animal también puede inmunizarse con la GARP derivada de un animal que no sea un humano, tal como un ratón o una rata. En este caso, se puede seleccionar un anticuerpo aplicable a la enfermedad de un humano examinando la reactividad cruzada de la unión del anticuerpo obtenido a GARP heteróloga con GARP humana.

10 [0040] Además, las células que producen anticuerpos que producen un anticuerpo contra GARP se fusionan con células de mieloma de acuerdo con un método conocido (por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature (1975) 256, pág. 495-497, Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, pág. 365-367, Plenum Press, N. Y. (1980)) para establecer hibridomas, con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal.

[0041] Cabe destacar que la GARP usada como un antígeno puede obtenerse permitiendo que las células huésped produzcan genes de GARP de acuerdo con manipulación genética.

20 [0042] Específicamente, se produce un vector capaz de expresar un gen de GARP y el vector se introduce, a continuación, en las células huésped, de manera que el gen se exprese en las mismas y, después, la GARP expresada pueda purificarse. De ahora en adelante, se describirá específicamente un método de obtención de un anticuerpo contra GARP.

(1) Preparación de un antígeno

25 [0043] Los ejemplos de un antígeno usado para producir un anticuerpo anti-GARP pueden incluir GARP, un polipéptido que consiste en al menos 6 secuencias consecutivas parciales de aminoácidos del mismo, y un derivado preparado añadiendo cualquier secuencia de aminoácidos o portador dado a dicho GARP o a un polipéptido del mismo.

30 [0044] La GARP puede purificarse directamente a partir de los tejidos tumorales o células tumorales de un humano y pueden usarse después. Como alternativa, la GARP también puede obtenerse sintetizándola *in vitro*, o permitiendo que las células huésped la produzcan por manipulación genética.

35 [0045] De acuerdo con dicha manipulación genética, se puede obtener un antígeno, específicamente, incorporando el ADNc de GARP en un vector de expresión capaz de expresar el ADNc de GARP y, a continuación, sintetizando GARP en una solución que comprende enzimas, sustrato y materiales energéticos necesarios para la transcripción y traducción, o transformando las células huésped de otras procariotas o eucariotas con el fin de permitirles que expresen GARP.

40 [0046] También es posible obtener un antígeno como una proteína secretora permitiendo que una proteína de fusión formada ligando el ADN que codifica la región extracelular de GARP como una proteína de membrana al ADN que codifica la región constante de un anticuerpo, se exprese en un sistema huésped y/o vectorial adecuado.

45 [0047] El ADNc de GARP puede obtenerse por lo que se llama un método de PCR, que comprende la realización de una reacción en cadena de la polimerasa (de ahora en adelante, denominada "PCR"), por ejemplo, usando una biblioteca de ADNc que expresa el ADNc de GARP como una plantilla y también usando cebadores para la amplificación específica del ADNc de GARP (véase Saiki, R. K., et al. Science (1988) 239, pág. 487-489).

50 [0048] Un ejemplo de la síntesis *in vitro* de un polipéptido puede ser el Sistema de Traducción Rápida (RTS, por sus siglas en inglés) fabricado por Roche Diagnostics, pero no se limita al mismo.

55 [0049] Ejemplos de células procariotas usadas como células huésped pueden incluir *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*. Para transformar las células huésped con un gen de interés, las células huésped se transforman con un vector de plásmido que comprende un replicón derivado de especies compatibles con la huésped, en concreto, un origen de replicación y una secuencia reguladora. Como un vector, es preferible un vector que tenga una secuencia capaz de impartir la selectividad de un fenotipo a las células que se van a transformar.

60 [0050] Los ejemplos de las células eucariotas usadas como células huésped incluyen las células de vertebrados, insectos y levaduras. Los ejemplos de las células de vertebrados que se pueden usar frecuentemente incluyen células COS que son células de monos (Gluzman, Y., Cell (1981) 23, pág. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos de ratones NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y una línea celular de células de ovario de hámster chino deficientes

en dihidrofolato reductasa (células CHO, ATCC CCL-61) (Urlaub, G. y Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, pág. 4126-4220), aunque no se limiten a ellas.

5 **[0051]** El transformante obtenido de esta forma puede cultivarse de acuerdo con métodos ordinarios y un polipéptido de interés puede producirse dentro o fuera de las células del cultivo.

10 **[0052]** Como medios usados en el cultivo, se pueden seleccionar diversos tipos de medios usados habitualmente según sea apropiado dependiendo del tipo de las células huésped adoptadas. Si las células huésped son *Escherichia coli*, por ejemplo, los antibióticos tales como la ampicilina o IPMG pueden añadirse a un medio de LB según sea necesario y también puede usarse el medio resultante.

15 **[0053]** Una proteína recombinante producida dentro o fuera de las células de un transformante como resultado del cultivo descrito anteriormente puede separarse y/o purificarse por diversos tipos de métodos de separación conocidos, utilizando las propiedades físicas o las propiedades químicas de la proteína.

20 **[0054]** Los ejemplos específicos del método pueden incluir un tratamiento que usa un precipitante de proteína ordinario, ultrafiltración, diversos tipos de cromatografía líquida tales como la cromatografía de tamiz molecular (filtración en gel), la cromatografía de absorción, la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de afinidad, un método de diálisis y una combinación de los mismos.

25 **[0055]** Además, al añadir una etiqueta de histidina que consiste en 6 residuos a una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficientemente usando una columna de afinidad de níquel. En caso contrario, al conectar la región Fc de IgG a una proteína recombinante que se va a expresar, la proteína puede purificarse eficientemente usando una columna de Proteína A.

[0056] Al combinar los métodos descritos anteriormente entre sí, se puede producir un polipéptido de interés a gran escala con un alto rendimiento y una gran pureza.

(2) Producción de un anticuerpo anti-GARP monoclonal

30 **[0057]** Un ejemplo de un anticuerpo que se une específicamente a GARP puede ser un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a GARP. Un método de obtención de dicho anticuerpo monoclonal es el siguiente.

35 **[0058]** Para la producción de un anticuerpo monoclonal, las siguientes etapas de trabajo son necesarias generalmente.

[0059] Específicamente, las etapas de trabajo necesarias incluyen:

- (a) purificación de un biopolímero usado como un antígeno,
- (b) una etapa de inmunizar un animal con el antígeno por inyección, recoger la sangre del animal, examinar el título del anticuerpo para determinar el periodo de extirpación del bazo del animal y, a continuación, preparar las células que producen anticuerpos,
- (c) preparación de las células de mieloma (de ahora en adelante denominadas "mielomas"),
- (d) fusión celular entre las células que producen anticuerpos y los mielomas,
- (e) selección de un grupo de hibridomas que producen un anticuerpo de interés,
- (f) división en clones unicelulares (clonación),
- (g) opcionalmente, el cultivo de hibridomas para la producción masiva de anticuerpos monoclonales o la cría de animales en los que los hibridomas se trasplantan, y
- (h) el análisis de la actividad fisiológica y la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos de esta forma o el examen de las propiedades del anticuerpo como un reactivo de etiquetado.

50 **[0060]** De ahora en adelante, se describirá en detalle un método de producción de un anticuerpo monoclonal junto con las etapas descritas anteriormente. Sin embargo, el método de producción del anticuerpo mencionado anteriormente no se limita al mismo y, por ejemplo, también se pueden usar las células que producen anticuerpos distintos de las células esplénicas y los mielomas.

(a) Purificación de un antígeno

55 **[0061]** Como un antígeno, se puede usar GARP preparada por el método descrito anteriormente o una parte de la misma.

60 **[0062]** Como alternativa, también se pueden usar como un antígeno una fracción de membrana preparada a partir de las células somáticas recombinantes que expresan GARP o dichas células somáticas que expresan GARP por

sí mismas o, además, un péptido parcial de la proteína de la presente invención, que se sintetiza químicamente de acuerdo con un método bien conocido para un experto en la materia.

(b) Preparación de células que producen anticuerpos

5 **[0063]** El antígeno obtenido en la etapa (a) se mezcla con un agente auxiliar, tal como un adyuvante completo o incompleto de Freund, o alumbre de potasio, para preparar un inmunógeno y, a continuación, se inmuniza a un animal de experimentación con el inmunógeno. Como dicho un animal de experimentación, se puede usar un animal usado en métodos conocidos para producir hibridomas sin ningún problema. Ejemplos específicos de dicho animal que se puede usar en el presente documento incluyen un ratón, una rata, una cabra, una oveja, un bovino
10 y un caballo. Desde el punto de vista de la disponibilidad de las células de mieloma que se van a fusionar con las células que producen anticuerpos extirpadas, etc., se usa preferiblemente un ratón o una rata como el animal que se va a inmunizar.

15 **[0064]** Las cepas de ratas y ratones usadas realmente no están particularmente limitadas. En el caso de los ratones, ejemplos de las cepas que se pueden usar en el presente documento incluyen A, AKR, BALB/c, BDP, BA, CE, C3H, 57BL, C57BL, C57L, DBA, FL, HTH, HT1, LP, NZB, NZW, RF, R III, SJL, SWR, WB, y 129. Por otro lado, en el caso de las ratas, ejemplos de la cepa que se puede usar en el presente documento incluyen Wistar, Low, Lewis, Sprague Dawley, ACI, BN, y Fischer.

20 **[0065]** Estos ratones y ratas están disponibles en criaderos y distribuidores de animales de experimentación, tales como CLEA Japan, Inc. y CHARLES RIVER LABORATORIES JAPAN, INC.

25 **[0066]** Entre otros, teniendo en cuenta la compatibilidad de fusión con las células de mieloma que se exponen a continuación, la cepa BALB/c en el caso de los ratones y las cepas Wistar y Low en el caso de las ratas, son particularmente preferibles como animales que se van a inmunizar.

30 **[0067]** Además, teniendo en cuenta la homología entre los antígenos de humanos y ratones, también es preferible usar ratones cuyo mecanismo biológico de eliminación de anticuerpos se haya reducido, en concreto, ratones con enfermedades autoinmunes.

[0068] La edad de estos ratones o ratas después de la inmunización es preferiblemente de 5 a 12 semanas y más preferiblemente de 6 a 8 semanas.

35 **[0069]** Para inmunizar animales con GARP o un recombinante del mismo, se pueden aplicar métodos conocidos, que se describen en detalle, por ejemplo, en Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), etc.

40 **[0070]** Entre estos métodos de inmunización, un método preferiblemente aplicado en la presente invención es específicamente el siguiente método, por ejemplo.

45 **[0071]** Es decir, en primer lugar, las células en las que se usa una fracción de proteína de membrana como un antígeno o en las que se ha expresado un antígeno se administran por vía intradérmica o intraperitoneal a un animal.

[0072] Para mejorar la eficiencia de inmunización, es preferible el uso combinado de los mismos. Si se lleva a cabo la administración intradérmica en una primera mitad del régimen de administración y la administración intraperitoneal se lleva a cabo en una última mitad del mismo o solamente en la instancia final de la administración, la eficiencia de inmunización puede mejorar particularmente.

50 **[0073]** El calendario de administración del antígeno es diferente dependiendo del tipo de animal que se va a inmunizar, las diferencias individuales, etc. En general, son preferibles de 3 a 6 dosis de antígeno y un intervalo de dosificación de 2 a 6 semanas, y son más preferibles 3 o 4 dosis de antígeno y un intervalo de dosificación de 2 a 4 semanas.

55 **[0074]** La dosis aplicada de un antígeno es diferente dependiendo del tipo de animal que se va a inmunizar, diferencias individuales, etc. Es generalmente de 0,05 a 5 mg y preferiblemente, aproximadamente, de 0,1 a 0,5 mg.

60 **[0075]** El refuerzo se lleva a cabo de 1 a 6 semanas, preferiblemente de 2 a 4 semanas y más preferiblemente de 2 a 3 semanas, después de la administración del antígeno descrita anteriormente.

[0076] La dosis aplicada del antígeno, cuando se lleva a cabo el refuerzo, es diferente dependiendo del tipo de

animal, del tamaño del mismo, etc. En el caso de un ratón, por ejemplo, la dosis aplicada del antígeno es generalmente de 0,05 a 5 mg, preferiblemente de 0,1 a 0,5 mg y más preferiblemente, aproximadamente, de 0,1 a 0,2 mg.

- 5 **[0077]** De 1 a 10 días, preferiblemente de 2 a 5 días y más preferiblemente 2 o 3 días después de que se haya completado el refuerzo descrito anteriormente, las células esplénicas o los linfocitos que comprenden células que producen anticuerpos se eliminan asépticamente del animal inmunizado. En ese momento, se mide el título del anticuerpo. Un animal, en el que el título del anticuerpo haya aumentado lo suficiente, se usa como una fuente de suministro de células que producen anticuerpos, de manera que se pueda mejorar la eficiencia de las operaciones

10 posteriores.

[0078] Los ejemplos del método de medición de un título de anticuerpo usado en el presente documento pueden incluir un método RIA y un método ELISA, aunque no se limitan a los mismos.

- 15 **[0079]** Con respecto a la medición de un título de anticuerpo en la presente invención, el método ELISA puede, por ejemplo, llevarse a cabo de acuerdo con los siguientes procedimientos.

[0080] En primer lugar, un antígeno purificado o parcialmente purificado se absorbe en la superficie de una fase sólida, tal como una placa de 96 pocillos para ELISA, y otra superficie sólida en la que dicho antígeno no se absorba, se cubre con una proteína irrelevante para el antígeno, tal como albúmina de suero bovino (de ahora en adelante, denominada "BSA"). Las superficies se lavan y después se les permite entrar en contacto con una muestra diluida en serie usada como un anticuerpo primario (por ejemplo, un suero de ratón), de manera que a un anticuerpo en la muestra se le permita unirse al antígeno descrito anteriormente.

- 25 **[0081]** Después, un anticuerpo marcado con enzimas contra el anticuerpo de ratón se añade como un anticuerpo secundario, de manera que se le permita unirse al anticuerpo de ratón, seguido de un lavado. Después de esto, un sustrato de la enzima se añade al mismo y se mide entonces un cambio en la absorbancia debido al desarrollo del color en función de la descomposición del sustrato, etc., de manera que se calcule el título del anticuerpo.

30 **[0082]** Las células que producen anticuerpos pueden estar separadas de las células esplénicas o linfocitos del animal inmunizado de acuerdo con métodos conocidos (por ejemplo, , Kohler et al., Nature (1975) 256, pág. 495, Kohler et al., Eur. J. Immunol. (1977) 6, pág. 511, Milstein et al., Nature (1977), 266, pág. 550; Walsh, Nature, (1977) 266, pág. 495). Por ejemplo, en el caso de las células esplénicas, se puede adoptar un método común que comprende picar el bazo, después filtrar las células a través de una malla de acero inoxidable y suspender el filtrado en el Medio Esencial Mínimo Eagle (MEM) para separar las células que producen anticuerpos.

35

(c) Preparación de las células de mieloma (de ahora en adelante denominadas "mielomas")

[0083] Las células de mieloma usadas en la fusión celular no están limitadas particularmente y las células pueden seleccionarse de líneas celulares conocidas, según sea apropiado y después pueden usarse. Teniendo en cuenta los problemas de conveniencia en la selección de hibridomas a partir de células fusionadas, se usan preferiblemente líneas celulares deficientes en HGPRT (hipoxantina-GUANINA-fosforribosil-transferasa), cuyos procesos de selección han sido establecidos.

40

[0084] Es decir, los ejemplos de dichas líneas celulares deficientes en HGPRT incluyen: derivados de ratón X63-Ag8 (X63), NS1-ANS11 (NS1), P3X63-Ag8. U1 (P3U1), X63-Ag8.653 (X63.653), SP2/0-Ag14 (SP2/0), MPC11-45.6TG1.7 (45.6TG), FO, S149/5XXO, y BU. 1; derivados de rata 210. RSY3. Ag. 1. 2.3 (Y3); y derivados de humano U266AR (SKO-007), GM1500-GTG-A12 (GM1500), UC729-6, LICR-LOW-HMy2 (HMy2) y 8226AR/NIP4-1 (NP41). Estas líneas celulares deficientes en HGPRT están disponibles en, por ejemplo, en la American Type Culture Collection (ATCC).

50

[0085] Estas líneas celulares se subcultivan en un medio adecuado, tal como un medio de 8-azaguanina [un medio preparado añadiendo 8-azaguanina a un medio RPMI-1640 que comprende glutamina, 2-mercaptoetanol, gentamicina y suero fetal de ternero (de ahora en adelante, denominado "FCS")], Medio de Dulbecco Modificado de Iscove (de ahora en adelante, denominado "IMDM"), o Medio Eagle Modificado de Dulbecco (de ahora en adelante, denominado "DMEM"). Tres o cuatro días antes de la fusión celular, las células se subcultivan en un medio normal [por ejemplo, medio ASF104 que comprende 10 % de FCS (fabricado por Ajinomoto Co., Inc.)] para garantizar no menos de 2×10^7 células el día de la fusión celular.

55

(d) Fusión celular

60 **[0086]** Las células que producen anticuerpos pueden fusionarse con células de mieloma, según sea apropiado, de acuerdo con métodos conocidos (Weir, D. M., Handbook of Experimental Immunology, Vol. I. II. III., Blackwell Scientific Publications, Oxford (1987), Kabat, E. A. y Mayer, M. M., Experimental Immunochemistry, Charles C

Thomas Publisher Springfield, Illinois (1964), etc.) bajo condiciones en las que la tasa de supervivencia de las células no se reduzca excesivamente.

5 **[0087]** Los ejemplos de dicho método que se puede usar en el presente documento incluyen un método químico que comprende mezclar las células que producen anticuerpos con células de mieloma en una solución de polímeros de alta concentración, tal como polietilenglicol, y un método físico que utiliza simulación eléctrica. De entre estos métodos, un ejemplo específico del método químico descrito anteriormente es el siguiente.

10 **[0088]** Es decir, cuando el polietilenglicol se usa como una solución de polímeros de alta concentración, las células que producen anticuerpos se mezclan con células de mieloma en una solución de polietilenglicol con un peso molecular de 1500 a 6000, preferiblemente de 2000 a 4000 a una temperatura de 30 °C a 40 °C, preferiblemente, de 35 °C a 38 °C, y durante 1 a 10 minutos, preferiblemente durante 5 a 8 minutos.

(e) Selección del grupo de hibridomas

15 **[0089]** El método de selección de hibridomas obtenido por la fusión celular descrita anteriormente no está limitado particularmente. En general, se aplica un método de selección de HAT (hipoxantina-aminopterina-timidina) (Kohler et al., Nature (1975) 256, pág. 495; Milstein et al., Nature (1977) 266, pág. 550).

20 **[0090]** Este método es efectivo cuando los hibridomas se obtienen usando células de mieloma de una línea celular deficiente en HGPRT que no puede sobrevivir en aminopterina.

[0091] Específicamente, las células no fusionadas y los hibridomas se cultivan en un medio de HAT, de manera que solamente a los hibridomas que son resistentes a la aminopterina se les permite permanecer y crecer de forma selectiva.

25 (f) División en clones unicelulares (clonación)

30 **[0092]** Como métodos de clonación de hibridomas, se pueden aplicar, por ejemplo, métodos conocidos tales como un método de metilcelulosa, un método de agarosa blanda o un método de dilución limitante (véase, por ejemplo, Barbara, B. M. y Stanley, M. S.: Selected Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman y Company, San Francisco (1980)). De entre estos métodos, los métodos de cultivo tridimensional, tal como un método de metilcelulosa, son particularmente preferibles. Por ejemplo, un grupo de hibridomas formado por fusión celular está suspendido en un medio de metilcelulosa, tal como ClonaCell-HY Selection Medium D (fabricado por StemCell Technologies, núm. 03804), y a continuación se cultiva. Después, las colonias de hibridomas formadas se cosechan, de manera que se puedan obtener los hibridomas monoclonales. Se cultiva cada una de las colonias de hibridomas cosechadas y el sobrenadante del cultivo de hibridomas obtenido, en el que se observa un título de anticuerpos estable, se selecciona como una cepa de hibridoma que produce anticuerpos monoclonales de GARP.

40 **[0093]** Los ejemplos de la cepa de hibridomas establecida de esta forma pueden incluir hibridomas GARP 151D y 198D. En la presente descripción, un anticuerpo producido por hibridomas de GARP 151D y 198D se denomina "anticuerpo 151D" o "anticuerpo 198D", o simplemente se denomina "151D" o "198D." Los anticuerpos 151D y 198D, como los producidos por los hibridomas correspondientes anteriores, son anticuerpos de ratas que no están dentro del alcance literal de las reivindicaciones.

45 **[0094]** La región variable de cadena pesada del anticuerpo 151D tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 15 en la lista de secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo 151D tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 17 en la lista de secuencias. Cabe destacar que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 15 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 14 en la lista de secuencias. Cabe también destacar que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 17 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 16 en la lista de secuencias.

50 **[0095]** La región variable de cadena pesada del anticuerpo 198D tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 19 en la lista de secuencias. Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo 198D tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 21 en la lista de secuencias. Cabe destacar que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 19 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 18 en la lista de secuencias. Cabe también destacar que la secuencia de aminoácidos de la región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 21 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 20 en la lista de secuencias.

(g) Preparación de anticuerpos monoclonales mediante cultivo de hibridomas

[0096] Los hibridomas seleccionados de esta forma se cultivan, de manera que los anticuerpos monoclonales puedan obtenerse eficientemente. Antes de realizar el cultivo, es deseable cribar hibridomas que produzcan un anticuerpo monoclonal de interés.

[0097] Para este cribado, se pueden adoptar métodos conocidos.

[0098] El título del anticuerpo se puede medir en la presente invención, por ejemplo, por el método ELISA descrito en la sección (b) anterior.

[0099] Los hibridomas obtenidos por los métodos mencionados anteriormente pueden preservarse en nitrógeno líquido o en un congelador a una temperatura de -80 °C o menos en forma de estado congelado.

[0100] Después de que se haya completado la clonación, los hibridomas se cultivan mientras se sustituye el medio HT por un medio normal.

[0101] El cultivo en masa se lleva a cabo por un cultivo giratorio o cultivo escurridor, usando una botella de cultivo grande. Se purifica un sobrenadante obtenido a partir de este cultivo en masa de acuerdo con métodos bien conocidos para un experto en la materia, tal como filtración en gel, con el fin de obtener un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína de la presente descripción.

[0102] Además, los hibridomas se inyectan en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa (por ejemplo, BALB/c descrita anteriormente) o un ratón Nu/Nu, y a los hibridomas se les permite crecer en los mismos, con el fin de obtener ascitis que comprenden una gran cantidad de anticuerpos monoclonales de la presente invención.

[0103] Cuando los hibridomas se administran en la cavidad abdominal de dicho ratón, se puede obtener una cantidad mayor de ascitis si se ha administrado previamente aceite mineral, tal como 2,6,10,14-tetrametilpentadecano (pristano), al ratón (de 3 a 7 días antes de la administración de hibridomas).

[0104] Por ejemplo, supongamos que previamente se ha administrado un agente inmunosupresor en la cavidad abdominal de un ratón de la misma cepa que los hibridomas, de manera que las células T se desactiven. Veinte días después de la inyección, se suspenden de 10^6 a 10^7 hibridomas y/o células clonales en un medio que no comprende suero (0,5 ml) y, después, se administra la suspensión en la cavidad abdominal. Cuando el abdomen normal se ha hinchado y la ascitis se ha acumulado, se recoge la ascitis del ratón. De acuerdo con este método, se puede obtener un anticuerpo monoclonal en una concentración que es de alrededor 100 veces o más que en una solución de cultivo.

[0105] El anticuerpo monoclonal obtenido por el método descrito anteriormente puede purificarse, por ejemplo, por el método descrito en Weir, D. M.: Handbook of Experimental Immunology, Vol. I, II, III, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1978).

[0106] El anticuerpo monoclonal obtenido de esta forma tiene un antígeno de alta especificidad a GARP.

(h) Ensayo de anticuerpos monoclonales

[0107] El isotipo y el subtipo de los anticuerpos monoclonales obtenidos puede determinarse de la siguiente manera.

[0108] En primer lugar, los ejemplos del método de ensayo pueden incluir un método de Ouchterlony, un método ELISA y un método RIA.

[0109] El método de Ouchterlony es simple, pero cuando la concentración de un anticuerpo monoclonal es baja, un procedimiento de concentración es necesario.

[0110] Por otro lado, cuando se usa el método ELISA o el método RIA, un sobrenadante de cultivo se reacciona directamente con una fase sólida adsorbida de antígeno, y se usa un anticuerpo que corresponde a diversos isotipos o subclases de inmunoglobulina como un anticuerpo secundario, de manera que se puedan identificar el isotipo y el subtipo del anticuerpo monoclonal.

[0111] Como un método más simple, también se puede utilizar un kit de identificación disponible en el mercado (por ejemplo, Mouse Typer Kit; fabricado por BioRad).

[0112] Además, la cuantificación de una proteína puede llevarse a cabo por un método de Folin Lowry y un método de cálculo del valor a partir de la absorbancia a 280 nm [$1,4 \text{ (DO 280)} = 1 \text{ mg/ml de inmunoglobulina}$].

[0113] Además, también en un caso donde las etapas de la (a) a la (h) en la (2) anterior se llevan a cabo otra vez y se obtiene un anticuerpo monoclonal independientemente por separado, se puede obtener un anticuerpo que tiene propiedades equivalente a aquellas de un anticuerpo 105F (que no está dentro del alcance literal de las reivindicaciones), un anticuerpo 110F (que no está dentro del alcance literal de las reivindicaciones) un anticuerpo derivado de 151D (anticuerpo 151D humanizado) y un anticuerpo derivado de 198D (anticuerpo 198D humanizado). Un ejemplo de dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une al mismo epítipo, al cual se une cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. El anticuerpo 105F reconoce las porciones de la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 366 a la 377, de la 407 a la 445 y de la 456 a la 470 en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de GARP, y se une a las mismas; el anticuerpo 110F reconoce las porciones de la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 54 a la 112 y de la 366 a la 392, en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de GARP, y se une a las mismas; el anticuerpo derivado de 151D (anticuerpo 151D humanizado) reconoce la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 352 a la 392 en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de GARP, y se une a las mismas; el anticuerpo derivado de 198D (anticuerpo 198D humanizado) reconoce la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 18 a la 112, en la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) de GARP y se une a las mismas. En consecuencia, los ejemplos particulares del epítipo mencionado anteriormente pueden incluir las regiones mencionadas anteriormente en la secuencia de aminoácidos de GARP.

[0114] Si un anticuerpo monoclonal recién preparado se une a un péptido parcial o a una estructura parcial tridimensional a la que se une el anticuerpo 105F mencionado anteriormente, etc., se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo, al que se une el anticuerpo 105F descrito anteriormente, etc. Además, al confirmar que el anticuerpo monoclonal compite con los anticuerpos descritos anteriormente, tal como el anticuerpo 105F en la unión de los anticuerpos a GARP (es decir, el anticuerpo monoclonal interfiere en la unión de los anticuerpos descritos anteriormente tal como el anticuerpo 105F a GARP), se puede determinar que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo, al que se une el anticuerpo 105F descrito anteriormente, etc., aunque no se haya determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Cuando se confirma que el anticuerpo monoclonal se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 105F, etc., entonces se espera considerablemente que el anticuerpo monoclonal tenga propiedades equivalentes a los anticuerpos descritos anteriormente tal como el anticuerpo 105F.

(3) Otros anticuerpos

[0115] El anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos recombinantes genéticamente que se han modificado artificialmente con el propósito de reducir la antigenicidad heterogénea para los seres humanos, tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y los anticuerpos humanos descritos anteriormente, así como también los anticuerpos monoclonales descritos anteriormente contra GARP. Estos anticuerpos se pueden producir por métodos conocidos.

[0116] El anticuerpo obtenido puede purificarse a un estado homogéneo. Para separar y purificar el anticuerpo, se pueden usar los métodos de separación y purificación usados para las proteínas ordinarias. Por ejemplo, cromatografía en columna, filtración, ultrafiltración, desalinización, diálisis, electroforesis preparativa en gel de poliacrilamida, enfoque isoeléctrico, etc., se seleccionan apropiadamente y se combinan entre sí, de manera que el anticuerpo pueda separarse y purificarse (Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshak et al. eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual, Ed Harlow y David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)), pero los ejemplos de los métodos de separación y purificación no se limitan a los mismos.

[0117] Los ejemplos de la cromatografía pueden incluir cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de filtración en gel, cromatografía en fase inversa y cromatografía de absorción.

[0118] Estas técnicas cromatográficas pueden llevarse a cabo usando cromatografía líquida, tal como HPLC o FPLC.

[0119] Los ejemplos de la columna usada en la cromatografía de afinidad pueden incluir una columna de Proteína A y una columna de Proteína G. Los ejemplos de la columna que implican el uso de la Proteína A pueden incluir Hyper D, POROS y Sepharose F. F. (Pharmacia).

[0120] También, usando un portador de antígeno inmovilizado, un anticuerpo puede purificarse utilizando la actividad de unión del anticuerpo al antígeno.

[0121] Los anticuerpos obtenidos se evalúan, en términos de su actividad de unión al antígeno, de acuerdo con el método descrito en los Ejemplos que se exponen a continuación, etc., de manera que se pueda seleccionar un anticuerpo preferido.

[0122] La estabilidad de un anticuerpo se puede usar como un indicador para la comparación de las propiedades de los anticuerpos. Un calorímetro de barrido diferencial (DSC, por sus siglas en inglés) es un dispositivo capaz de medir con rapidez y exactitud un punto medio de desnaturalización térmica (T_m) que es un buen indicador para la estabilidad estructural relativa de una proteína. Al usar el DSC para medir los valores de T_m y hacer una comparación con respecto a los valores obtenidos, se pueden comparar las diferencias en la estabilidad térmica. Es conocido que la estabilidad de preservación de un anticuerpo tiene una correlación determinada con la estabilidad térmica del anticuerpo (Lori Burton, et al., *Pharmaceutical Development and Technology* (2007) 12, pp. 265-273), y, por consiguiente, se puede seleccionar un anticuerpo preferido usando la estabilidad térmica como un indicador. Los ejemplos de otros indicadores para la selección de un anticuerpo pueden incluir alto rendimiento en células huésped adecuadas y baja aglutinación en una solución acuosa. Por ejemplo, como un anticuerpo con el rendimiento más alto no siempre exhibe la estabilidad térmica más alta, es necesario seleccionar el anticuerpo más adecuado para la administración a un humano determinándolo exhaustivamente en función de los indicadores mencionados anteriormente.

[0123] Un ejemplo del anticuerpo humano anti-GARP de la presente descripción que no está dentro del alcance literal de las reivindicaciones puede ser un anticuerpo humano anti-GARP obtenido por el método de presentación en fagos descrito anteriormente y los ejemplos específicos pueden incluir un anticuerpo 105F y un anticuerpo 110F, cada uno de los cuales tiene la siguiente estructura.

[0124] La cadena pesada del anticuerpo 105F tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 118 es una región variable, mientras que la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 119 a la 448 es una región constante. En SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias, esta región variable tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 26 a la 35, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 50 a la 66 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 99 a la 107. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 2 se muestra en la Figura 2.

[0125] La cadena ligera del anticuerpo 105F tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 112 es una región variable, mientras que la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 113 a la 217 es una región constante. En SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias, esta región variable tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 23 a la 36, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 52 a la 58 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 91 a la 101. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 3 se muestra en la Figura 3.

[0126] La cadena pesada del anticuerpo 110F tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 123 es una región variable, mientras que la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 124 a la 453 es una región constante. En SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias, esta región variable tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 26 a la 35, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 50 a la 66 y CDRH3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 99 a la 112. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 4 se muestra en la Figura 4.

[0127] La cadena ligera del anticuerpo 110F tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias. En la secuencia de aminoácidos de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 111 es una región variable, mientras que la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 112 a la 216 es una región constante. En SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias, esta región variable tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 23 a la 36, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 52 a la 58 y CDRL3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 91 a la 100. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 5 se muestra en la Figura 5.

[0128] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 105F que se muestra en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 354 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 105F, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los

nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 355 a la 1344 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo 105F. Como se muestra en SEQ ID NO: 6, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable tiene un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 76 a la 105 que codifica CDRH1, un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 148 a la 198 que codifica CDRH2 y un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 295 a la 321 que codifica CDRH3. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 6 se muestra en la Figura 6.

[0129] La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 105F que se muestra en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 336 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 en la lista de secuencias codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 105F, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 337 a la 651 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo 105F. Como se muestra en SEQ ID NO: 7, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable tiene un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 67 a la 108 que codifica CDRL1, un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 154 a la 174 que codifica CDRL2 y un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 271 a la 303 que codifica CDRL3. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 7 se muestra en la Figura 7.

[0130] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 110F que se muestra en SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 8 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 369 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 8 en la lista de secuencias codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 110F, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 370 a la 1359 codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo 110F. Como se muestra en SEQ ID NO: 8, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable tiene un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 76 a la 105 que codifica CDRH1, un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 148 a la 198 que codifica CDRH2 y un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 295 a la 336 que codifica CDRH3. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 8 se muestra en la Figura 8.

[0131] La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 110F que se muestra en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 333 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 110F, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 334 a la 648 codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo 110F. Como se muestra en SEQ ID NO: 9, la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable tiene un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 67 a la 108 que codifica CDRL1, un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 154 a la 174 que codifica CDRL2 y un polinucleótido que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 271 a la 300 que codifica CDRL3. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 9 se muestra en la Figura 9.

[0132] Como se ha descrito en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, además del anticuerpo humano anti-GARP descrito anteriormente, incluso en un caso donde un anticuerpo se obtiene independientemente, por separado, de acuerdo con un método distinto del método de obtención de un anticuerpo descrito anteriormente, se pueden obtener los anticuerpos que tienen citotoxicidad equivalente a la del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F. Un ejemplo de dicho anticuerpo puede ser un anticuerpo que se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F.

[0133] Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura parcial tridimensional, a la que se une el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F, se puede determinar que el anticuerpo producido se une al mismo epítipo, al que se une el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F. Además, al confirmar que el anticuerpo en cuestión compite con el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F en la unión de los mismos a GARP (es decir, el anticuerpo en cuestión interfiere en la unión del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F a GARP), se puede determinar que el anticuerpo en cuestión se une al mismo epítipo, al que se une el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F, aunque no se haya determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Si se confirma que el anticuerpo en cuestión se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F, entonces se espera considerablemente que el anticuerpo en cuestión tenga una citotoxicidad equivalente a la del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F.

[0134] Además, el anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos recombinantes genéticamente modificados artificialmente. Estos anticuerpos se pueden producir usando métodos conocidos. En el presente documento se describe, aunque no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, un anticuerpo que tiene, al menos, los mismos 6 CDR que la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo 105F o el anticuerpo 110F descritos anteriormente, y que también tiene actividad de ADCC y actividad inhibidora en la función inmunosupresora de Treg. El anticuerpo en cuestión no se limita a un anticuerpo específico, siempre que tenga las propiedades mencionadas anteriormente. El anticuerpo es más preferiblemente un anticuerpo que tiene la región variable de cadena pesada y la región variable de cadena ligera del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F descritos anteriormente.

[0135] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, al combinar las secuencias que muestran una homología alta con la secuencia de aminoácidos de cadena pesada y la secuencia de aminoácidos de cadena ligera del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F entre sí, es posible seleccionar un anticuerpo que tenga una actividad equivalente al anticuerpo descrito anteriormente. Dicha homología es una homología de generalmente 80 % o más, preferiblemente 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, y lo más preferiblemente 99 % o más (sin embargo, cada CDR es idéntica a la de cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente). Además, también es posible seleccionar un anticuerpo que tiene una actividad equivalente a cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente al incorporar una secuencia de aminoácidos que comprende la sustitución, delección o adición de uno o más residuos de aminoácidos a la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada o la cadena ligera descritas anteriormente (excluyendo cada sitio de CDR).

[0136] Todavía más, los ejemplos del anticuerpo anti-GARP pueden incluir los siguientes anticuerpos quiméricos, que no están dentro del alcance literal de las reivindicaciones, y anticuerpos humanizados.

[0137] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, un ejemplo de un anticuerpo quimérico puede incluir anticuerpos en los que una región variable y una región constante son heterólogas entre sí, dicho anticuerpo quimérico formado al conjugar la región variable de un anticuerpo derivado de ratón o de rata a una región constante derivada de humano (véase Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 81, 6851-6855, (1984)).

[0138] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, un anticuerpo quimérico derivado de un anticuerpo de GARP 151D antihumano de rata es un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 117 que se muestra en SEQ ID NO: 15, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 109 que se muestra en SEQ ID NO: 17, y este anticuerpo quimérico puede tener una región constante derivada de cualquier humano dado.

[0139] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, un anticuerpo quimérico derivado de un anticuerpo de GARP antihumano de rata 198D es un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 120 que se muestra en SEQ ID NO: 19, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 109 que se muestra en SEQ ID NO: 21, y este anticuerpo quimérico puede tener una región constante derivada de cualquier humano dado.

[0140] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, los ejemplos de un anticuerpo quimérico pueden incluir: un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 25 en la lista de secuencias, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 27 en la misma; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 469 que se muestra en SEQ ID NO: 29 en la lista de secuencias, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que consiste en residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 31 en la misma.

[0141] Cabe destacar que, en la secuencia de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 25 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 136 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 137 a la 466 es una región constante.

[0142] Cabe destacar que, en la secuencia de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 27 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 130 a la 234 es una región constante.

[0143] Cabe destacar que, en la secuencia de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 29 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 139 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 140 a la 469 es una región constante.

[0144] Cabe destacar que, en la secuencia de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 31 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 130 a la 234 es una región constante.

[0145] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo c151D que se muestra en SEQ ID NO: 25 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 24 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 57 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 24 en la lista de secuencias codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo c151D, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 en la misma codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo c151D, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 409 a la 1398 en la misma codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo c151D

[0146] Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo c151D que se muestra en SEQ ID NO: 27 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 60 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 26 en la lista de secuencias codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo c151D, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 en la misma codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo c151D, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702 en la misma codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo c151D

[0147] Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo c198D que se muestra en SEQ ID NO: 29 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 28 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 57 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 28 en la lista de secuencias codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo c198D, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 417 en la misma codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo c198D, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 418 a la 1407 en la misma codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo c198D

[0148] Además, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo c198D que se muestra en SEQ ID NO: 31 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 30 en la lista de secuencias. La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 60 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 30 en la lista de secuencias codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo c198D, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 en la misma codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo c198D, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702 en la misma codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo c198D

[0149] Los ejemplos del anticuerpo humanizado de la invención incluyen un anticuerpo humanizado formado al incorporar solamente una región que determina la complementariedad (CDR) en un anticuerpo derivado de humano (véase Nature (1986) 321, pág. 522-525), y un anticuerpo humanizado formado al trasplantar los residuos de aminoácidos en algunas estructuras, así como secuencias de CDR, a un anticuerpo humano de acuerdo con un método de injerto de CDR (Publicación Internacional Núm.WO90/07861).

[0150] Sin embargo, el anticuerpo humanizado de la invención derivado del anticuerpo 151D no está limitado a un

anticuerpo humanizado específico, siempre que contenga las secuencias de región variable proporcionadas en partes (a) y (b) de la reivindicación 1, reteniendo de esta forma todas las 6 secuencias de CDR del anticuerpo 151D y tiene la actividad reivindicada.

5 **[0151]** Cabe destacar que la región variable de cadena pesada del anticuerpo 151D tiene CDRH1 (GFTFSNYYMA) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 26 a la 35 en SEQ ID NO: 15 en la lista de secuencias, CDRH2 (SIGTVGGNTY) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 50 a la 59 en SEQ ID NO: 15 en la misma, y CDRH3 (EDYGGFPH) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 99 a la 106 en SEQ ID NO: 15 en la misma

10 **[0152]** Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo 151D tiene CDRL1 (KASQNVGTNVD) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 24 a la 34 en la SEQ ID NO: 17 en la lista de secuencias, CDRL2 (GASNRYT) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 50 a la 56 en la SEQ ID NO: 17 en la misma y CDRL3 (LQYKYNPYT) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 89 a la 97 en la SEQ ID NO: 17 en la misma

20 **[0153]** Además, la región variable de cadena pesada del anticuerpo 198D tiene CDRH1 (GFSLTFSFHV) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 26 a la 35 en SEQ ID NO: 19 en la lista de secuencias, CDRH2 (TISGGGGTY) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 50 a la 58 en SEQ ID NO: 19 en la misma, y CDRH3 (ISGWGHYYVMDV) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 98 a la 109 en SEQ ID NO: 19 en la misma

25 **[0154]** Además, la región variable de cadena ligera del anticuerpo 198D tiene CDRL1 (QASEDIYSGLA) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 24 a la 34 en la SEQ ID NO: 21 en la lista de secuencias, CDRL2 (GAGSLQD) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 50 a la 56 en la SEQ ID NO: 21 en la misma y CDRL3 (QQGLKFPLT) que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 89 a la 97 en la SEQ ID NO: 21 en la misma

35 **[0155]** La descripción proporciona ejemplos de un anticuerpo humanizado del anticuerpo 151D de rata que comprende cualquier combinación dada de: una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33 (h151D-H1) o 35 (h151D-H4) en la lista de secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de (1) anterior, y (3) una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (1) anterior; y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37 (h151D-L1) o 39 (h151D-L4) en la lista de secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (4) anterior, y (6) anteriores, una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (4) anterior; Los anticuerpos 151D humanizados de la invención tienen específicamente las siguientes combinaciones de regiones variables cadena pesada y de cadena ligera: h151D-H1L1 y h151D-H4L4. Las secuencias de estos anticuerpos de la invención se proporcionan a continuación. Otras combinaciones y variaciones de secuencias mencionadas anteriormente no están dentro del alcance literal de las reivindicaciones.

55 **[0156]** La descripción proporciona ejemplos de un anticuerpo humanizado del anticuerpo 198D de rata que comprende cualquier combinación dada de: una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en una cualquiera de (1) una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41 (h198D-H3) en la lista de secuencias, (2) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de al menos 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de (1) anterior, y (3) una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (1) anterior; y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que consiste en una cualquiera de (4) una secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43 (h198D-L4) en la lista de secuencias, (5) una secuencia de aminoácidos que tiene una homología

de al menos 95 % o más con la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (4) anterior, y (6) una secuencia de aminoácidos que comprende una delección, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco distinta de en cada secuencia de CDR en la secuencia de la (4) anterior; El anticuerpo 198D humanizado de la invención tiene específicamente la siguiente

5 combinaciones de regiones variables cadena pesada y de cadena ligera: h198D-H3L4. La secuencia de este anticuerpo de la invención se proporciona a continuación. Otras combinaciones y variaciones de secuencias mencionadas anteriormente no están dentro del alcance literal de las reivindicaciones.

[0157] La combinación de una cadena pesada y de una cadena ligera de los anticuerpos 151D humanizados de la invención es la siguiente: un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que tiene una región variable de

10 cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las

15 posiciones de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37; y un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 39.

[0158] Los ejemplos de una combinación más preferida de los mismos pueden incluir: un anticuerpo (h151D-H1L1) que consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 33 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 37; y un anticuerpo (h151D-H4L4) que consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ

20 ID NO: 35 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 39.

[0159] La combinación de una cadena pesada y de una cadena ligera de los anticuerpos 198D humanizados de la invención es un anticuerpo que consiste en una cadena pesada que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la

25 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que tiene una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

[0160] Un ejemplo de una combinación más preferida del mismo puede ser un anticuerpo (h198D-H3L4) que consiste en una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 41 y una

30 cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 43.

[0161] Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, al combinar las secuencias que muestran una homología alta con las secuencias de aminoácidos de cadena pesada descritas anteriormente y las secuencias de aminoácidos de cadena ligera, es posible seleccionar un anticuerpo

40 que tenga citotoxicidad equivalente a cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente. Dicha homología es una homología de generalmente 80 % o más, preferiblemente 90 % o más, más preferiblemente 95 % o más, y lo más preferiblemente 99 % o más. Además, al combinarlas entre sí, las secuencias de aminoácidos que comprenden una sustitución, delección o adición de uno o varios residuos de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada o de una cadena ligera, es posible seleccionar un anticuerpo

45 que tenga citotoxicidad equivalente a cada uno de los anticuerpos descritos anteriormente.

[0162] Cabe destacar que el término "varios" se usa en la presente descripción para referirse a de 1 a 10, de 1 a 9, de 1 a 8, de 1 a 7, de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4, de 1 a 3, o 1 o 2.

[0163] La sustitución de aminoácidos en la presente descripción es preferiblemente una sustitución conservadora de aminoácidos. La sustitución conservadora de aminoácidos es una sustitución que se produce dentro de un grupo de aminoácidos asociado con ciertas cadenas laterales de aminoácidos. Los grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: grupo ácido = ácido aspártico y ácido glutámico; grupo básico = lisina, arginina e

50 histidina; grupo no polar = alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina y triptófano; y grupo polar no cargado = glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos preferidos son los siguientes: grupo hidroxil alifático = serina y treonina; grupo que contiene amida = asparagina y glutamina; grupo alifático = alanina, valina, leucina e isoleucina; y grupo aromático = fenilalanina, triptófano y tirosina. Dicha sustitución de aminoácidos se lleva a cabo preferiblemente en la medida en que no se alteren las propiedades de una sustancia que tenga la secuencia original de aminoácidos.

55

[0164] La homología entre dos tipos de secuencias de aminoácidos puede determinarse usando parámetros por defecto de la versión 2.2.2 del algoritmo Blast (Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, y David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs," Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402). El algoritmo Blast también puede usarse accediendo a www.ncbi.nlm.nih.gov/blast a través de Internet. Cabe destacar que la homología entre

60

la secuencia de nucleótidos del anticuerpo descrito en el presente documento y la secuencia de nucleótidos de otro anticuerpo también puede determinarse usando el algoritmo Blast.

5 **[0165]** En la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 151D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 33 o 35 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 136 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 137 a la 466 es una región constante.

10

[0166] Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 151D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 37 o 39 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 130 a la 234 es una región constante.

15

[0167] Asimismo, en la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 198D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 41 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 19 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 20 a la 139 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 140 a la 469 es una región constante.

20

[0168] Además, en la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 198D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 43 en la lista de secuencias, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 1 a la 20 es una secuencia de señal, la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 21 a la 129 es una región variable, y la secuencia de aminoácidos que consiste en los residuos de aminoácidos en las posiciones de la 130 a la 234 es una región constante.

25

[0169] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 151D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 33 o 35 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 32 o 34 en la lista de secuencias, respectivamente. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 33 se muestra en la Figura 21, la secuencia de SEQ ID NO: 35 se muestra en la Figura 23, la secuencia de SEQ ID NO: 32 se muestra en la Figura 31 y la secuencia de SEQ ID NO: 34 se muestra en la Figura 33, respectivamente.

30

[0170] La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 57 en cada secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo 151D humanizado, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 en la misma codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 151D humanizado, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 409 a la 1398 en la misma codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo 151D humanizado.

40

[0171] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 198D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 41 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 40 en la lista de secuencias. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 41 se muestra en la Figura 25, y la secuencia de SEQ ID NO: 40 se muestra en la Figura 35.

45

[0172] La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 57 en la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente codifica la secuencia de señal de cadena pesada del anticuerpo 198D humanizado, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 417 en la misma codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo 198D humanizado, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 418 a la 1407 en la misma codifica la región constante de cadena pesada del anticuerpo 198D humanizado.

50

[0173] La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 151D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 37 o 39 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 36 o 38 en la lista de secuencias, respectivamente. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 37 se muestra en la Figura 22, la secuencia de SEQ ID NO: 39 se muestra en la Figura 24, la secuencia de SEQ ID NO: 36 se muestra en la Figura 32 y la secuencia de SEQ ID NO: 38 se muestra en la Figura 34, respectivamente.

55

[0174] La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 60 en cada secuencia de nucleótidos codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo 151D humanizado, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la

60

61 a la 387 en la misma codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 151D humanizado, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702 en la misma codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo 151D humanizado.

5 **[0175]** La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 198D humanizado que se muestra en SEQ ID NO: 43 en la lista de secuencias está codificada por la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 42 en la lista de secuencias. Además, la secuencia de SEQ ID NO: 43 se muestra en la Figura 26, y la secuencia de SEQ ID NO: 42 se muestra en la Figura 36.

10 **[0176]** La secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 60 en la secuencia de nucleótidos mencionada anteriormente codifica la secuencia de señal de cadena ligera del anticuerpo 198D humanizado, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 en la misma codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo 198D humanizado, y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702 en la misma codifica la región constante de cadena ligera del anticuerpo 198D humanizado.

[0177] La homología entre estas secuencias de nucleótidos y las secuencias de nucleótidos de otros anticuerpos puede también determinarse usando el algoritmo Blast.

20 **[0178]** Como se describe en el presente documento, pero no dentro del alcance literal de las reivindicaciones, un ejemplo adicional del anticuerpo puede ser un anticuerpo humano que se une al mismo epítipo al que también se une el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado. Un anticuerpo humano anti-GARP se refiere a un anticuerpo humano que solamente tiene la secuencia genética de un anticuerpo derivado de cromosomas humanos. El anticuerpo humano anti-GARP se puede obtener por el método mencionado anteriormente.

[0179] Si un anticuerpo humano recién producido se une a un péptido parcial o a una estructura parcial tridimensional, a la que se une el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado, se puede determinar que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado. Además, al confirmar que el anticuerpo humano compite con el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado en la unión de los mismos a GARP (es decir, el anticuerpo humano interfiere en la unión del anticuerpo 151D humanizado o del anticuerpo 198D humanizado a GARP), se puede determinar que el anticuerpo humano se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado, aunque no se haya determinado la secuencia o estructura específica del epítipo. Si se confirma que el anticuerpo humano en cuestión se une al mismo epítipo al que se une el anticuerpo 151D humanizado o el anticuerpo 198D humanizado, entonces se espera considerablemente que el anticuerpo humano tenga una citotoxicidad equivalente a la del anticuerpo 151D humanizado o del anticuerpo 198D humanizado.

[0180] El anticuerpo quimérico o el anticuerpo humano, que no están dentro del alcance literal de las reivindicaciones, o el anticuerpo humanizado obtenido por los métodos mencionados anteriormente se evalúa por los métodos descritos más adelante en los Ejemplos, etc., en términos de actividad de unión a un antígeno y, por consiguiente, se puede seleccionar un anticuerpo preferido.

[0181] La presente invención también incluye una modificación de un anticuerpo. El término "modificación" se usa en el presente documento para referirse al anticuerpo de la presente invención que está modificado química o biológicamente. Los ejemplos de dicha modificación química incluyen la unión de una fracción química a un esqueleto de aminoácidos y la modificación química de una cadena de carbohidratos N-ligada u O-ligada. Los ejemplos de dicha modificación biológica incluyen los anticuerpos que han sufrido una modificación postraducciona (por ejemplo, una modificación de la cadena glucídica N-ligada u O-ligada, procesamiento N-terminal o C-terminal, desamidación, isomerización del ácido aspártico y oxidación de la metionina), y los anticuerpos al N-terminal del cual se añade un residuo de metionina como resultado de haberse permitido su expresión usando células huésped procariontas. Además, dicha modificación también incluye anticuerpos marcados para posibilitar la detección o aislamiento del anticuerpo de la presente invención o un antígeno, tal como, por ejemplo, un anticuerpo marcado con enzimas, un anticuerpo marcado fluorescentemente y un anticuerpo marcado por afinidad. Dicha modificación del anticuerpo de la presente invención es útil para la mejora de la estabilidad y retención en sangre del anticuerpo original de la presente invención, reducción en antigenicidad, detección o aislamiento de dicho anticuerpo o antígeno, etc.

[0182] Además, al regular una modificación de la cadena glucídica (glicosilación, desfucosilación, etc.) que se une al anticuerpo de la presente invención, se puede mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos. Como técnicas de regulación de la modificación de la cadena glucídica de un anticuerpo, aquellas descritas en los documentos WO99/54342, WO2000/61739, WO2002/31140, etc., son conocidas, pero las técnicas no se limitan a las mismas. El anticuerpo de la presente invención también incluye anticuerpos en los que se ha regulado la modificación de la cadena glucídica mencionada anteriormente.

[0183] Después de que se haya aislado un gen de anticuerpo, el gen se introduce en un huésped adecuado para producir un anticuerpo, usando una combinación adecuada de un huésped y un vector de expresión. Un ejemplo específico del gen de anticuerpo puede ser una combinación de un gen que codifica la secuencia de cadena pesada del anticuerpo descrito en la presente descripción y un gen que codifica la secuencia de cadena ligera del anticuerpo descrito en el presente documento. Después de la transformación de las células huésped, un gen de la secuencia de cadena pesada y un gen de la secuencia de cadena ligera pueden insertarse en un único vector de expresión, o, por el contrario, estos genes pueden insertarse en vectores de expresión diferentes.

[0184] Cuando las células eucariotas se usan como huéspedes, se pueden usar células animales, células vegetales o microorganismos eucariotas. Los ejemplos de células animales incluyen células de mamíferos como las células COS que son células de mono (Gluzman, Y., Cell (1981) 23, pág. 175-182, ATCC CRL-1650), fibroblastos de ratón NIH3T3 (ATCC No. CRL-1658), y una línea celular de células de ovario de hámster chino deficientes en dihidrofolato reductasa (células CHO, ATCC CCL-61) (Urlaub, G. y Chasin, L. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, pág. 4126-4220).

[0185] Cuando se usan las células procariotas como huéspedes, se puede usar *Escherichia coli* o *Bacillus subtilis*, por ejemplo.

[0186] Un gen de anticuerpo de interés se introduce en estas células para su transformación, y las células transformadas se cultivan a continuación *in vitro* para obtener un anticuerpo. En el cultivo mencionado anteriormente, hay casos donde el rendimiento es diferente dependiendo de la secuencia del anticuerpo y, por consiguiente, es posible seleccionar un anticuerpo, que se produce fácilmente como un medicamento, a partir de los anticuerpos que tienen una actividad de unión equivalente usando el rendimiento como un indicador. En consecuencia, el anticuerpo de la presente invención también incluye un anticuerpo obtenido por el método descrito anteriormente para producir un anticuerpo que se caracteriza en que comprende una etapa de cultivo de las células huésped transformadas y una etapa de recogida de un anticuerpo de interés a partir del cultivo obtenido en la etapa mencionada anteriormente.

[0187] Se sabe que el residuo de lisina en el extremo carboxilo de la cadena pesada de un anticuerpo producido en células de mamíferos cultivadas se elimina (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), y también se sabe que los dos residuos de aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, glicina y lisina, se eliminan y que el residuo de prolina situado en el extremo carboxilo está recién amidado (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). Sin embargo, dicha delección y modificación de estas secuencias de cadena pesada no tienen una influencia en la actividad de unión del antígeno y en la función efectora (activación de complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, etc.) de un anticuerpo. En consecuencia, la presente invención también incluye un anticuerpo que ha sufrido la modificación mencionada anteriormente y los ejemplos específicos de dicho anticuerpo incluyen un mutante de delección que comprende una delección de 1 o 2 aminoácidos en el extremo carboxilo de la cadena pesada, y un mutante de delección formado por la amidación del mutante de delección mencionado anteriormente (por ejemplo, una cadena pesada en la que el residuo de prolina en el sitio del extremo carboxilo está amidado): Sin embargo, los mutantes de delección que implican una delección en el extremo carboxilo de la cadena pesada del anticuerpo de acuerdo con la presente invención no se limitan a los mutantes de delección descritos anteriormente, siempre que retengan la actividad de unión del antígeno y la función efectora. Dos cadenas pesadas que constituyen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención pueden ser de cualquier tipo de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en un anticuerpo de longitud completa y los mutantes de delección descritos anteriormente o una combinación de cualquiera de los dos tipos seleccionados del grupo mencionado anteriormente. La proporción de mutantes de delección individuales puede estar influida por los tipos de células de mamíferos cultivadas que producen el anticuerpo de acuerdo con la presente invención y las condiciones de cultivo. El ingrediente principal del anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser anticuerpos donde un residuo de aminoácido se elimina en cada uno de los extremos carboxilos de las dos cadenas pesadas.

[0188] Los ejemplos del isótopo del anticuerpo de la presente invención pueden incluir IgG (IgG1, IgG2, IgG3, y IgG4). Entre otros, IgG1 y IgG2 son preferibles.

[0189] Los ejemplos de la función general de un anticuerpo pueden incluir actividad de unión del antígeno, actividad de neutralización de la actividad de un antígeno, actividad de mejora de la actividad de un antígeno, actividad de ADCC, actividad de fagocitosis celular dependiente de anticuerpos (ADCP) y actividad citotóxica dependiente de complementos (CDC). La función del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es la actividad de unión a GARP, preferiblemente, actividad de ADCC y más preferiblemente citotoxicidad (actividad antitumoral) causada por la inhibición mediada por ADCC de la función de Treg. Además, el anticuerpo de la presente invención puede tener actividad de ADCP y/o actividad de CDC, así como actividad de ADCC. En particular, con respecto a los medicamentos que comprenden anticuerpos antitumorales existentes, se ha comunicado que los medicamentos actúan directamente en las células tumorales para bloquear las señales de crecimiento, que actúan directamente en las células tumorales para inducir señales de muerte celular, que suprimen la angiogénesis, que provocan la

actividad de ADCC a través de las células NK y que inducen la actividad de CDC a través del complemento para suprimir el crecimiento de las células tumorales (J Clin Oncol 28: 4390-4399. (2010), Clin Cancer Res; 16 (1); 11-20. (2010)). Sin embargo, con respecto a la actividad de ADCP del anticuerpo anti-GARP de acuerdo con la invención de la presente aplicación, al menos, los presentes inventores no sabían que la actividad de ADCP se

había comunicado como la actividad de un medicamento que comprende un anticuerpo antitumoral anti-GARP existente.

[0190] El anticuerpo de la presente invención puede ser un anticuerpo que se ha multimerizado para mejorar la afinidad para un antígeno. El anticuerpo que se va a multimerizar puede ser o un único tipo de anticuerpo o múltiples anticuerpos que reconocen múltiples epítomos de un único antígeno. Los ejemplos de un método de multimerización de un anticuerpo pueden incluir la unión de un dominio IgG CH3 a dos scFv (anticuerpos de cadena única), la unión de un anticuerpo a estreptavidina y la introducción de un motivo de hélice-giro-hélice.

[0191] El anticuerpo de la presente invención también puede ser un anticuerpo policlonal que es una mezcla de múltiples tipos de anticuerpos anti-GARP que tienen diferentes secuencias de aminoácidos. Un ejemplo del anticuerpo policlonal puede ser una mezcla de múltiples tipos de anticuerpos que tienen diferentes CDR. Como dicho anticuerpo policlonal, se puede usar un anticuerpo obtenido por el cultivo de una mezcla de células que producen anticuerpos diferentes y que después purifican el cultivo obtenido (véase WO2004/061104).

[0192] Como una modificación del anticuerpo, se puede usar un anticuerpo que se une a diversos tipos de moléculas, tal como polietilenglicol.

[0193] El anticuerpo de la presente invención puede ser además un conjugado formado por dicho anticuerpo y otro fármaco (inmunoconjugado). Dicho anticuerpo puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que se une a una sustancia radioactiva o a un compuesto que tiene acción farmacológica (Nature Biotechnology (2005) 23, pág. 1137-1146). Los ejemplos de dicho anticuerpo pueden incluir indio (111In) Capromab pendetida, tecnecio (99mTc) Nofetumomab merpentan, indio (111In) Ibritumomab, itrio (90Y) Ibritumomab, y yodo (131I) Tositumomab.

3. Medicamento que contiene un anticuerpo anti-GARP

[0194] Cualquier referencia a métodos del tratamiento en los párrafos posteriores de la descripción deben interpretarse como referencias para los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para su uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por terapia.

[0195] Dado que el anticuerpo obtenido por el método descrito en la sección "2 anterior. Producción de un anticuerpo anti-GARP monoclonal» exhibe citotoxicidad en Treg, también se puede usar como un medicamento, en particular, como un agente terapéutico para el cáncer y enfermedades infecciosas (en particular, la malaria y la infección por el VIH).

[0196] La citotoxicidad causada por un anticuerpo in vitro puede medirse en función de la actividad de supresión de las respuestas proliferativas de las células.

[0197] Por ejemplo, se cultiva una línea celular cancerosa que sobreexpresa GARP y los anticuerpos que tienen diferentes concentraciones se añaden al sistema del cultivo. Después, se puede medir la actividad inhibidora del anticuerpo sobre la formación de focos, la formación de colonias y el crecimiento de esferoides.

[0198] Se pueden medir los efectos terapéuticos *in vivo* de un anticuerpo sobre el cáncer de un animal de experimentación, por ejemplo, administrando el anticuerpo a un ratón desnudo en el que se ha trasplantado una línea celular tumoral que sobreexpresa GARP y, después, midiendo un cambio en las células cancerosas.

[0199] Los ejemplos del tipo de cáncer pueden incluir cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer en la sangre. Sin embargo, el tipo de cáncer no se limita a los ejemplos mencionados anteriormente, siempre que las células cancerosas, como objetivos terapéuticos, expresen GARP.

[0200] Como una sustancia usada en un medicamento aceptable para la composición farmacéutica de la presente invención, es preferible una sustancia que no es tóxica a un sujeto al que se le va a administrar la composición farmacéutica en términos de una dosis aplicada o una concentración aplicada.

[0201] La composición farmacéutica de la presente invención puede comprender una sustancia farmacéutica para alterar o retener pH, presión osmótica, viscosidad, transparencia, color, isotonicidad, esterilidad, estabilidad, solubilidad, velocidad de liberación sostenida, absortividad y permeabilidad. Los ejemplos de la sustancia farmacéutica pueden incluir las siguientes sustancias, pero no se limitan a las mismas: aminoácidos tales como

glicina, alanina, glutamina, asparagina, arginina y lisina; agentes antibacterianos; antioxidantes tales como ácido ascórbico, sulfato de sodio e hidrógenosulfito de sodio; tampones tales como un tampón de fosfato, citrato o borato, hidrogenocarbonato de sodio o una solución Tris-HCl; rellenos como el manitol o glicina; agentes quelantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, por sus siglas en inglés); agentes complejantes como cafeína, polivinilpirrolidina, β -ciclodextrina o hidroxipropil- β -ciclodextrina; agentes de carga como glucosa, manosa o dextrina; otros carbohidratos como monosacáridos o disacáridos; un agente colorante; un agente aromatizante; un diluyente; un emulsionante; polímeros hidrófilos como la polivinilpirrolidina; un polipéptido de bajo peso molecular; contraiones formadores de sal; antisépticos como cloruro de benzalconio, ácido benzoico, ácido salicílico, timerosal, alcohol fenílico, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico o peróxido de hidrógeno; disolventes como glicerina, propilenglicol o polietilenglicol; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; polisorbatos tal como agente de suspensión, éster de sorbitán, polisorbato 20 o polisorbato 80; tensioactivos como Tritón, trometamina, lecitina o colesterol; potenciadores de la estabilidad, como sacarosa o sorbitol; un agente de suspensión; potenciadores de la elasticidad, como cloruro de sodio, cloruro de potasio, manitol o sorbitol; agentes transportadores; excipientes; y/o adyuvantes farmacéuticos. Dicha sustancia farmacéutica se añade preferiblemente a un anticuerpo anti-GARP en una cantidad de 0,001 a 100 veces, en particular, 0,1 a 10 veces más que el peso del anticuerpo anti-GARP. La composición preferida de una composición farmacéutica en una formulación puede estar determinada, según sea apropiado, por un experto en la materia, dependiendo de la enfermedad objetivo, la ruta de administración aplicada, etc.

[0202] Un excipiente o un portador en la composición farmacéutica puede ser un líquido o un sólido. Un excipiente o un portador adecuados puede ser agua para inyección, solución salina normal, un líquido cefalorraquídeo artificial u otras sustancias usadas habitualmente en la administración parenteral. La solución salina normal neutra o solución salina normal que comprende albúmina de suero también puede usarse como un portador. La composición farmacéutica puede comprender un tampón de Tris con pH 7,0-8,5; un tampón de acetato con pH 4,0-5,5 y un tampón de citrato con pH 3,0-6,2. Además, estos tampones también pueden comprender sorbitol u otros compuestos.

[0203] Los ejemplos de la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GARP y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GARP y al menos un agente terapéutico contra el cáncer. La composición farmacéutica de la presente invención se prepara como un fármaco que tiene una composición seleccionada y una pureza necesaria en forma de un producto liofilizado o de un líquido. Dicha composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GARP y una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GARP y al menos un agente terapéutico contra el cáncer también puede moldearse en un producto liofilizado que comprende un excipiente adecuado, tal como la sacarosa.

[0204] Un agente terapéutico contra el cáncer comprendido junto con un anticuerpo anti-GARP en la composición farmacéutica descrita anteriormente puede administrarse a un individuo simultáneamente o por separado o continuamente junto con un anticuerpo anti-GARP. En caso contrario, el agente terapéutico contra el cáncer y el anticuerpo anti-GARP puede cada uno administrarse al sujeto en intervalos de administración diferentes. Ejemplos de dichos agentes terapéuticos contra el cáncer pueden incluir abraxano, carboplatino, cisplatino, gemcitabina, irinotecán (CPT-11), paclitaxel, pemetrexed, sorafenib, vinblastina, los fármacos descritos en la Publicación Internacional Núm. WO2003/038043, análogos de LH-RH (leuporelina, goserelina, etc.), fosfato de estramustina, antagonistas de estrógenos (tamoxifeno, raloxifeno, etc.) e inhibidores de aromatasas (anastrozol, letrozol, exemestano, etc.). Sin embargo, los ejemplos del agente terapéutico contra el cáncer no se limitan a los fármacos descritos anteriormente, siempre que los agentes tengan actividad antitumoral.

[0205] El sujeto que va a ser el objetivo para la administración no está limitado particularmente. Es preferiblemente un mamífero y más preferiblemente un humano.

[0206] La composición farmacéutica de la presente invención puede prepararse para su uso en la administración parenteral o para su uso en la absorción gastrointestinal que implica la administración oral. La composición y concentración de una formulación puede determinarse dependiendo del método de administración. Con respecto a la afinidad de un anticuerpo anti-GARP comprendido en la composición farmacéutica de la presente invención para GARP, en concreto, la constante de disociación (valor K_d) del anticuerpo anti-GARP a GARP, conforme aumenta la afinidad (es decir, el valor de K_d es bajo), la composición farmacéutica puede exhibir efectos medicinales, aunque disminuya la dosis aplicada de la misma a un ser humano. en función de estos resultados, también se puede determinar la dosis aplicada de la composición farmacéutica de la presente invención a un humano. Cuando un anticuerpo anti-GARP de tipo humano se administra a un humano, el anticuerpo puede administrarse a una dosis de desde, alrededor de, 0,001 hasta 100 mg/kg una vez o varias veces en intervalos de 1 a 180 días. Los ejemplos de la forma de la composición farmacéutica de la presente invención pueden incluir una inyección que incluye una infusión por goteo, un supositorio, un agente transnasal, un agente sublingual y un agente de absorción transdérmica.

[0207] De ahora en adelante, los siguientes ejemplos se proporcionan con fines solamente ilustrativos.

Ejemplos

- [0208]** En los siguientes ejemplos, a menos que se especifique lo contrario, las operaciones individuales de manipulación genética se han llevado a cabo de acuerdo con el método descrito en "Molecular Cloning" (Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.), publicado por Cold Spring Harbor Laboratory Press en 1989) u otros métodos descritos en los manuales de experimentación usados por expertos en la materia, o cuando se han usado reactivos o kits disponibles en el mercado, los ejemplos se han llevado a cabo de acuerdo con las instrucciones incluidas en los productos disponibles en el mercado.

Ejemplo comparativo 1: Obtención de anticuerpos

- 10 1)-1 Separación de Fab anti-GARP mediante barrido en presentación de fagos

- [0209]** Se usó una biblioteca de fagos Fab n-CoDeR (BioInvent) en la separación de la unión Fab a GARP. Usando el reactivo EZ-Link NHS-Chromogenic-Biotin (Thermo Scientific), se biotiniló GARP (R&D Systems). Para el barrido en fase líquida, la GARP biotinilada se solidificó en Dynabeads Streptavidin M-280 (Life Technologies) y, a continuación, se añadieron los fagos. Los fagos no unidos se eliminaron por una operación de lavado usando un imán (DynaMag-2, Life Technologies). Después, se recogieron los fagos unidos a GARP tratándolos con tripsina (Sigma-Aldrich) y se amplificaron usando *Escherichia coli*. En total, las operaciones de barrido se llevaron a cabo tres veces y, usando enzimas de restricción, se cortó un fragmento de ADN que codificaba Fab a partir de un fagémido policlonal, y a continuación se cargó en un vector de expresión para *Escherichia coli*. A continuación, se transformó *Escherichia coli* TOP10F' (Life Technologies) con el vector de expresión, y se permitió que Fab se expresara en presencia de IPTG (Sigma-Aldrich). El Fab obtenido se sometió a un cribado por ELISA

1)-2 Cribado de Fab de unión a GARP por ELISA

- [0210]** Se añadieron 50 µL de GARP, que se había diluido a 2 µg/mL con PBS (solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (pH 7,4) que contiene cloruro de sodio 0,138 M y cloruro de potasio 0,0027 M; Sigma-Aldrich), a cada pocillo de una placa Maxi-sorp (Black, Nunc) de 384 pocillos, y se incubó durante toda la noche a 4 °C para recubrir la placa. Como alternativa, se añadieron 50 µL de NeutrAvidina (Life Technologies) que se había diluido a 1 µg/mL con PBS a dicha placa Maxi-sorp de 384 pocillos para recubrir la placa (incubando durante toda la noche a 4 °C). A continuación, se lavó la placa tres veces con un tampón ELISA (PBS (Sigma-Aldrich) suplementado con 0,05 % de Tween-20 (Bio-RAD)) y se añadió GARP biotinilado a la misma (1 pmol/50 µL PBS/pocillo), seguido de una incubación a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando. La placa se lavó con tampón ELISA tres veces, se bloqueó con Blocker Casein (Thermo Scientific) y se volvió a lavar con el tampón ELISA tres veces. Después, se añadió un sobrenadante de cultivo que contenía Fab producido por *Escherichia coli* y, a continuación, se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando. La placa se lavó tres veces con el tampón ELISA y se añadieron 50 µL de anticuerpo antihumano F(ab')₂ (R&D Systems) marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP) diluida 2500 veces. La placa se incubó de nuevo a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando. La mezcla de reacción se lavó tres veces con el tampón ELISA y, a continuación, se añadió a los pocillos el sustrato quimioluminiscente SuperSignal Pico ELISA (Thermo Scientific). Diez minutos después, se midió la quimioluminiscencia usando un lector de placas (Envision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer) y se aisló el Fab unido a GARP.

1)-3 Determinación de la secuencia de nucleótidos del clon positivo en ELISA

- [0211]** Las regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de los clones positivos en ELISA (105F y 110F) se analizaron por un método *Dye Terminator* (BigDye (marca registrada) Terminator v3.1, Life Technologies). Las secuencias de los cebadores principales usados en la secuenciación son las siguientes.

[0212]

- 50 Cebador A: 5'-GAA ACA GCT ATG AAA TAC CTA TTG C-3' (SEQ ID NO: 10)
 Cebador B: 5'-GCC TGA GCA GTG GAA GTC C-3' (SEQ ID NO: 11)
 Cebador C: 5' -TAG GTA TTT CAT TAT GAC TGT CTC-3' (SEQ ID NO: 12)
 Cebador D: 5'-CCC AGT CAC GAC GTT GTAAA CG-3' (SEQ ID NO: 13)

- [0213]** Como resultado del análisis descrito anteriormente, se determinaron las secuencias de nucleótidos de las regiones variables de los genes del anticuerpo 105F y del anticuerpo 110F.

[0214] La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 105F era una secuencia que consistía en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 354 en la secuencia de nucleótidos

que se muestra en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias, la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 105F era una secuencia que consistía en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 336 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 en la lista de secuencias.

5

[0215] La secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo 110F era una secuencia que consistía en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 369 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 8 en la lista de secuencias, y la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo 110F era una secuencia que consistía en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 1 a la 333 en la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias.

10

1) -4: Preparación de IgG de longitud completa y expresión y purificación de IgG

[0216] La IgG de longitud completa de los clones positivos en ELISA incluyendo 105F y 110F se preparó por el siguiente método.

15

[0217] Se determinó una secuencia de nucleótidos que codifica Fab y, después, se especificaron las secuencias de nucleótidos que corresponden a las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de cada anticuerpo especificadas en la 1)-3 anterior.

20

[0218] De acuerdo con un método común, la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena pesada descrita anteriormente se ligó a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena pesada de IgG₁ humana (CH1 + región Fc: la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 119 a la 448 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias), y también la secuencia de nucleótidos de la región variable de la cadena ligera descrita anteriormente se ligó a una secuencia de nucleótidos que codifica la región constante de la cadena ligera de IgG₁ humana (CL: la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 113 a la 217 en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias). Después, el ligado obtenido se insertó en un vector de expresión para células animales, tal como pcDNA3.3 (Invitrogen), para construir un vector de expresión IgG para células animales.

25

30

[0219] La secuencia de nucleótidos del vector de expresión IgG construido se volvió a analizar, de manera que se confirmase que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 105F era la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 6 en la lista de secuencias, y que la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 105F era la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 7 en la lista de secuencias.

35

[0220] También se confirmó que la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de longitud completa del anticuerpo 110F era la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 8 en la lista de secuencias, y que la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 110F era la secuencia de nucleótidos que se muestra en SEQ ID NO: 9 en la lista de secuencias.

40

[0221] Además, en función de las secuencias de nucleótidos descritas anteriormente, se determinaron las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 105F codificado por las secuencias de nucleótidos, y las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa y la cadena ligera de longitud completa del anticuerpo 110F codificado por las secuencias de nucleótidos.

45

[0222] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 105F era la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 2 en la lista de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mismo era la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 3 en la lista de secuencias.

50

[0223] La secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 110F era la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 4 en la lista de secuencias, y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del mismo era la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 en la lista de secuencias.

55

[0224] La IgG del anticuerpo 105F o del anticuerpo 110F se expresó de forma transitoria insertando el vector de expresión IgG descrito anteriormente para las células animales en células *FreeStyle* 293F (Life Technologies), y el IgG resultante se purificó usando una columna de afinidad de proteína A (HiTrap Mab Select SuRe, GE Healthcare), según fuese necesario. A continuación, el tampón en el que se disolvió la IgG se sustituyó con PBS que usa Vivaspin 20 (7k MWCO, GE Healthcare) y el resultante se sometió, después, a la siguiente etapa "1)-5".

60

1)-5 Confirmación de la unión de IgG purificado a GARP de acuerdo con ELISA

[0225] Se añadieron 100 µl de GARP humana (R&D Systems, número de catálogo: 6055-LR) diluida a 1 µg/mL con PBS a cada pocillo de una placa Maxi-sorp de 96 pocillos (Black, Nunc), y, a continuación, se incubó la placa durante toda la noche a 4 °C para recubrir la placa

[0226] La placa se lavó con tampón ELISA tres veces y se bloqueó con *Blocker Casein* a temperatura ambiente durante 1 hora. La placa se lavó con el tampón ELISA tres veces, y se añadieron 100 µl de 50 nM del anticuerpo 105F, 50 nM del anticuerpo 110F, 50 nM de IgG humana (Jackson Immuno Research), 50 nM del anticuerpo anti-GARP de ratón (Plato-1, ENZO Life Science) o 50 nM de IgG de ratón (Jackson Immuno Research) a los pocillos y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando.

[0227] La placa se lavó con el tampón ELISA tres veces. Después de ello, se añadieron 100 µl del anticuerpo anti Fc humano marcado con HRP (R&D Systems), que se había diluido 5000 veces con PBS, a los pocillos tratados con el anticuerpo 105F, anticuerpo 110F o IgG humana. Por otro lado, se añadieron 100 µl del anticuerpo anti Fc antirratón marcado con HRP (R&D Systems), que se había diluido 5000 veces con PBS, a los pocillos tratados con el anticuerpo anti-GARP de ratón y IgG de ratón. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora mezclando.

[0228] La placa se lavó con el tampón ELISA cinco veces y, después, se añadió 0,1mL de sustrato de sustrato quimioluminiscente *SuperSignal Pico* ELISA a los pocillos. Diez minutos después, se midió la quimioluminiscencia usando un lector de placas (Envision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer).

[0229] Como resultado, se demostró que el anticuerpo 105F y el anticuerpo 110F se unieron a GARP (Figura 10) como hizo el anticuerpo anti-GARP disponible en el mercado.

Ejemplo comparativo 2: Unión a células que expresan el gen del antígeno

[0230] En cuanto al vector de expresión de GARP, se compró un clon de ADNc de GARP humana (Origene), y, después, se clonó en un vector pcDNA3.1 (+) (Invitrogen) de acuerdo con un método común. Después, se confirmó la secuencia de nucleótidos del mismo.

[0231] El vector de expresión de GARP y el vector pcDNA3.1 usados como control se transfectaron cada uno en las células HEK-293T (ATCC: CRL-11268), usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las células resultantes se cultivaron en un medio DMEM (Invitrogen) suplementado con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, Hyclone) durante toda la noche en un 5 % de CO₂ a 37 °C. A continuación, las células se cosecharon de la placa por el tratamiento TrypLE Express (Invitrogen), y las células se lavaron con tampón MACS (PBS que contiene 0,5 % de BSA y 2mM de EDTA; Miltenyi Biotec) dos veces y se suspendieron en la misma solución descrita anteriormente. El anticuerpo 105F y la IgG humana de control (ENZO, Life Science) se añadieron cada una a la suspensión celular, y las células se incubaron durante 15 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón MACS. El anticuerpo antiIgG marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) se añadió y se suspendió, y las células se incubaron además a 4 °C durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón MACS y, a continuación, las células se fijaron con PFA al 1 % (preparado a partir de una solución de paraformaldehído al 32 % (ELECTRON MICROSCOPY SCIENCES)), y se midieron usando un citómetro de flujo (FACS Canto II; Becton Dickinson). Los datos se analizaron usando FlowJo (TreeStar). Las células muertas se eliminaron del análisis separando las células teñidas con Horizon FVS450 (Becton Dickinson). Después, se generó un histograma de la intensidad de la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas.

[0232] En términos de las células HEK-293T transfectadas con el vector de control, solo un histograma de intensidad de fluorescencia para el anticuerpo 105F fue similar al de la IgG de control. Por otro lado, en términos de las células HEK-293T que expresan GARP, se confirmó que el histograma para el anticuerpo 105F se desplazó hacia un lado de intensidad de fluorescencia fuerte, en comparación con el histograma para la IgG de control (Figura 11). A partir de los resultados mencionados anteriormente, se averiguó que el anticuerpo 105F se unía específicamente a la GARP expresada por las células HEK-293T.

Ejemplo comparativo 3: Unión a células endógenas que expresan GARP

3)-1 Análisis de la citometría de flujo usando células L428

[0233] Una forma marcada con fluorescencia del anticuerpo 105F se preparó usando un kit de etiquetado de anticuerpos monoclonales Alexa Fluor 647 (Invitrogen). Las células L428 (obtenidas a partir de DSMZ) se lavaron dos veces con tampón MACS y se suspendieron en la misma solución. El anticuerpo 105F marcado se añadió a la suspensión celular, y las células se incubaron durante 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con tampón MACS y las células se fijaron después con PFA al 1 % y se midieron usando un citómetro de flujo (FACS Canto II, Becton Dickinson). Los datos se analizaron usando FlowJo (TreeStar). Las células muertas se eliminaron

separando las células teñidas con Horizon FVS450. Después, se generó un histograma de la intensidad de la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas. en comparación con el histograma de la intensidad de fluorescencia para las células L428 solas, el histograma de las células L428 al que se había añadido el anticuerpo 105F se desplazó hacia el lado de intensidad de fluorescencia fuerte. Por consiguiente, se confirmó que el anticuerpo 105F se unía a la GARP expresada de forma endógena por las células (Figura 12).

3)-2 Análisis de la citometría de flujo usando Treg humana

[0234] Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés) de un sujeto sano se separaron usando Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), y las células separadas se sembraron a 2×10^6 células/mL en medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS (de ahora en adelante, denominado "medio RP-F10") en una placa de 24 pocillos de baja adherencia (Costar). Un anticuerpo antiCD3 (BD Pharmingen) y un anticuerpo antiCD28 (BD Pharmingen) se añadieron a los pocillos y las células se cultivaron durante 20 horas. Después, las células se suspendieron en tampón FACS (HBSS (Invitrogen) suplementado con 10 mM HEPES (Invitrogen), 2 mM EDTA (Invitrogen), y 2 % FBS), y se añadieron a la suspensión el anticuerpo 105F marcado preparado en la 3)-1 anterior y un anticuerpo anti-GARP marcado con Alexa Fluor 647 (G14D9, eBioscience). Las células se incubaron durante 30 minutos. Las células se lavaron con tampón FACS y se añadió una solución de trabajo de fijación/permeabilización (eBioscience). Las células se incubaron además en hielo durante 30 minutos y las células se lavaron con tampón de permeabilización (eBioscience). Después de ello, se añadió un 2 % de suero de rata (eBioscience) a las células. Las células se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos y se añadió el anticuerpo antiFoxp3 marcado con PE (eBioscience), seguido de una incubación adicional a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las células se lavaron y se fijaron con una solución de fijación tisular que se preparó diluyendo dos veces una solución tampón de fosfato de paraformaldehído al 4 % (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) con D-PBS (Invitrogen) a 4 °C durante 15 minutos o más. Después de que se lavaran las células con tampón FACS, las células se midieron usando un citómetro de flujo (FACS Canto II; Becton Dickinson) y se analizaron usando FlowJo (Tree Star). Como resultado, el anticuerpo 105F se unió a Treg positivas en FoxP3 como lo hizo el anticuerpo anti-GARP disponible en el mercado (Figura 13).

Ejemplo comparativo 4: Propiedades del anticuerpo anti-GARP

4)-1 Actividad de ADCC

4)-1-1 Preparación de células efectoras

[0235] Las PBMC derivadas de voluntarios sanos se separaron de acuerdo con la 3)-2 anterior. Las células NK se purificaron a partir de PBMC usando un kit de aislamiento de células NK (Miltenyi Biotec). Las células NK obtenidas se incubaron durante toda la noche en un medio RP-F10 suplementado con 100 UI/mL de rhIL-2 (Novartis). Después, se contó el número de células vivas por una prueba de exclusión del azul de tripano y las células se volvieron a suspender en un medio RP-F10 a una densidad celular de 2×10^5 células/mL. Las células obtenidas se usaron como células efectoras.

4)-1-2 Preparación de células objetivo

[0236] Se mezclaron 30 μ L (1110 kBq) de Cromo-51 (^{51}Cr) con $0,6 \times 10^6$ células L428 descritas en el Ejemplo 3)-1 en un medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS, y las células se incubaron durante 2 horas en un 5 % de CO_2 a 37 °C, de manera que las células se radiomarcaran. Las células marcadas se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS y las células se volvieron a suspender en el mismo medio a 4×10^4 células/mL. Las células obtenidas se usaron como células objetivo.

4)-1-3 Ensayo de liberación de ^{51}Cr

[0237] El anticuerpo 105F, que se había diluido con un medio RP-F10, de manera que la concentración final estuviera a 1, 10, 100 o 1000 ng/mL, se dispensó en una cantidad de 50 μ L/pocillo en una microplaca de 96 pocillos con fondo en U (Costar), y las células objetivo se añadieron a los pocillos (50 μ L/pocillo). La placa se incubó a 4 °C durante 30 minutos. Posteriormente, las células efectoras se añadieron a los pocillos (100 μ L/pocillo) y la placa se incubó en un 5 % de CO_2 a 37 °C durante 4 horas. Después, se recogieron 50 μ L/pocillo de sobrenadante y se aplicó a LumaPlate (PerkinElmer) y la dosis de rayos gamma liberada se midió usando un contador gamma. La tasa de lisis celular causada por la actividad de ADCC se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$\text{Tasa de lisis celular (\%)} = (A-B) / (C-B) \times 100$$

A: Recuento del pocillo de muestra

5 B: Valor principal (n=3) del recuento de la liberación espontánea (pocillo sin anticuerpo y células efectoras). Tras añadir el anticuerpo y tras añadir las células efectoras, se añadieron 50 µL y 100 µL del medio RP-F10, respectivamente. Se llevaron a cabo las mismas operaciones que para los pocillos de las muestras distintas de las anteriores.

10 **[0238]** C: valor principal (n=3) de recuento de la liberación máxima (pocillo en el que las células objetivo se disolvieron con un tensioactivo. Tras añadir del anticuerpo, se añadieron 50 µL del medio RP-F10. Tras añadir las células efectoras, se añadieron 100 µL del medio RP-F10 suplementado con 2 % de (v/v) Triton-X100 (Sigma). Se llevaron a cabo las mismas operaciones que para los pocillos de muestras distintas de las anteriores.

15 **[0239]** Los resultados se muestran en la Figura 14. El anticuerpo 105F exhibió una actividad citolítica en las células L428 de forma dependiente de la concentración de anticuerpos. Por otro lado, la IgG humana de control no exhibió dicha actividad citolítica. Por consiguiente, el anticuerpo 105F tenía actividad de ADCC en las células L428 que expresan GARP endógena. Cabe destacar que los anticuerpos anti-GARP IgG1 humanos (MHG8 y LHG10) producidos en función de la información de la secuencia descrita en la Bibliografía de patente 1 no exhibió actividad de ADCC.

20 4)-2 Actividad inhibidora a la función de Treg

4)-2-1 Preparación de Treg, Teff (células T efectoras: células T auxiliares CD4 positivas CD25 negativas) y células accesorias

25 **[0240]** Las células T CD4 positivas separadas a partir de PBMC que se prepararon de la misma manera que en la 4)-1-1 anterior, usando un kit de AISLAMIENTO de células T CD4 (Miltenyi Biotec) y un anticuerpo anti CD4 marcado con FITC (Miltenyi Biotec) y un anticuerpo anti CD25 marcado con APC (Miltenyi Biotec) se añadieron a las células T CD4 positivas. Las células se incubaron a 4 °C durante 30 minutos. Después de que las células se lavaran, las células se suspendieron en un tampón MACS y las células CD4 positivas CD25 negativas (Teff) y las células CD4 positivas CD25 fuertemente positivas se separaron usando FACS Aria IIu (Becton Dickinson).

30 **[0241]** Por otro lado, las células CD3 positivas se eliminaron de PBMC usando microperlas CD3 (Miltenyi Biotec) y las células se irradiaron a una dosis de 1 C/kg (dosis absorbida: 38,76 Gy/kg (3876 Rad/kg)) usando un irradiador de rayos X (Hitachi Medical Corporation) para preparar células accesorias.

35 4)-2-2 Método de cocultivo y ensayo para la actividad inhibidora de la función de Treg

35 **[0242]** Como medio de cultivo, se usó el medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con penicilina y suplementada con penicilina y estreptomycin (Invitrogen), 1 × MEM NEAA (Invitrogen), 1 × piruvato de sodio (Invitrogen), 5 mM de Hepes y 5 % de suero AB masculino humano (Sigma). Las células Teff (2000 células/pocillo) y accesorias (20000 células/pocillo) se mezclaron y añadieron en cada pocillo de una microplaca de 96 pocillos con fondo en U, y se añadieron más Treg y se sembraron en los pocillos a 500 células/pocillo. Además, también se prepararon pocillos de control sin Treg. Un anticuerpo anti-CD3, un anticuerpo anti-CD28 y un anticuerpo 105F se añadieron a los pocillos a una concentración final de 50 o 10 µg/mL, y la placa se incubó durante 5 días en CO₂ al 5 % a 37 °C. A continuación, se preparó [3H]-timidina (PerkinElmer) a 18,5 kBq/mL y se añadió a cada pocillo de 20 µL/pocillo. Las células se incubaron además durante 18 horas. Las células se cosecharon en Filtermat A (PerkinElmer) usando un cosechador de células (Mach II, Tomtech), y la radiactividad de [3H]-timidina incorporada a las células se midió usando un contador de centelleo (MicroBeta, PerkinElmer). Los datos medidos se expresaron como recuento por minuto corregido (CCPM, por sus siglas en inglés).

50 **[0243]** Los anticuerpos anti-GARP IgG1 humanos (MHG8 y LHG10) producidos en función de la información de secuencia descrita en la Bibliografía de Patente 1 también se sometieron al sistema de experimentación presente.

4)-2-3 Cálculo de la actividad inhibidora

55 **[0244]** Se calculó el valor medio de tres pocillos en condiciones de cocultivo individuales. El valor disminuido de la proliferación en el cocultivo de Teff con Treg en comparación con el de Teff solo, se definió como "Tasa de supresión de la proliferación de Teff causada por Treg" (= 1 - [CCPM del cocultivo/CCPM de Teff solo]).

[0245] La actividad inhibidora de cada anticuerpo a la función de Treg se determinó restando la tasa de supresión de la proliferación de Teff por Treg en presencia de un anticuerpo de la tasa en ausencia de anticuerpo (= [tasa de

supresión al no añadir el anticuerpo] - [tasa de supresión al añadir cada anticuerpo]]. Cabe destacar que esta actividad inhibidora de una muestra se calcula cada vez en cada experimento.

- 5 [0246] Los resultados de la actividad inhibidora del anticuerpo 105F a la función de Treg a 50 µg/mL (tasa de inhibición: 72,6 %) se muestran en la Figura 15 y los resultados del anticuerpo 105F y los anticuerpos MHG-8 y LHG-10 (10 µg/mL cada uno) se muestran en la Figura 16. Los anticuerpos MHG-8 y LHG-10 no tuvieron actividad inhibidora de la función Treg (tasas de inhibición: 0,8 % y 0,0 % , respectivamente), mientras que el anticuerpo 105F inhibió significativamente la función Treg (tasa de inhibición: 65,8 %). La tasa de inhibición causada por la transducción de ARNsi a GARP en Treg fue de aproximadamente el 15 % , cuando se calculó aproximadamente usando los valores de la Figura 5A (CD4 + CD25 - (Teff) : Treg = 4 : 1) de la Bibliografía no de patente 10.

Ejemplo 5: Producción de anticuerpo de rata

5)-1 Preparación del vector de expresión de GARP

[0247] El vector de expresión descrito en el Ejemplo 2 se usó como un vector de expresión de GARP, y se usó EndoFree Plasmid Giga Kit (QIAGEN) para la producción en masa.

15 5)-2 Inmunización de ratas

- 20 [0248] Para la inmunización, se usaron ratas hembra WKY/lzm (Japan SLC, Inc.). En primer lugar, las extremidades inferiores de cada rata se pretrataron con hialuronidasa (SIGMA-ALDRICH) y se inyectó intramuscularmente un vector de expresión de GARP en los mismos sitios. Después, usando ECM830 (BTX), la electroporación *in vivo* se realizó en los mismos sitios usando un electrodo de dos agujas. Una vez cada dos semanas, se repitió la misma electroporación *in vivo* y se recogieron ganglios linfáticos o bazo de la rata, y se usaron en la producción de hibridomas.

5)-3 Producción de hibridomas

- 25 [0249] Los ganglios linfáticos o las células esplénicas se fusionaron con células de mieloma de ratón SP2/0-ag14 (ATCC, No.CRL-1581) de acuerdo con fusión celular, usando una unidad de fusión celular LF301(BEX) y las células se diluyeron con ClonaCell-HY Selection Medium D (StemCell Technologies) y se incubaron. Las colonias de hibridomas que aparecieron en cultivo se recogieron y seleccionaron como hibridomas monoclonales. Cada colonia de hibridomas se cultivó y el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma se usó para cribar los hibridomas que producen anticuerpos anti-GARP.

5)-4 Cribado de anticuerpos de acuerdo con el método celular ELISA

- 30 5)-4-1 Preparación de células que expresan el gen del antígeno para su uso en ELISA celular

- 35 [0250] Se prepararon células 293α (una línea celular de expresión estable derivada de células HEK-293 (ATCC: CRL-1573) que expresan integrina αv e integrina β3) a $7,5 \times 10^5$ células/mL en el medio DMEM (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS. De acuerdo con los procedimientos de transducción para el uso de Lipofectamine 2000 (Life Technologies), se transfectó en las células un vector de expresión de GARP o un vector pcDNA3.1 (+) usado como control negativo, y se dispensaron las células en una cantidad de 50 µl cada una en una placa de media área de 96 pocillos (Corning). Posteriormente, las células se cultivaron en el medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS durante 24 a 27 horas en un 5 % de CO₂ a 37 °C. Las células transfectadas obtenidas se usaron para ELIS celular en estado adhesivo.

5)-4-2 ELISA celular

- 40 [0251] Se eliminó el sobrenadante de cultivo de las células 293α transfectadas con los vectores de expresión preparados en el Ejemplo 5)-4-1, y el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma se añadió a las células 293α transfectadas con el vector de expresión de GARP o con el vector pcDNA3.1 (+). Las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron una vez con PBS (+) suplementado con un 5 % de FBS y, posteriormente, se añadió a los pocillos el anticuerpo antirrata de IgG peroxidasa producido en conejos (SIGMA) que se había diluido 500 veces con PBS (+) suplementado con 5 % FBS. Las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células en los pocillos se lavaron tres veces con PBS (+) suplementado con un 5 % de FBS y solución colorante OPD (que se había preparado disolviendo o-fenilendiamina dihidrocloruro (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y H₂O₂ en una solución OPD (0,05 M de citrato trisódico, 0,1 M de hidrogenofosfato disódico 12-agua; pH 4,5), de manera que las sustancias se convirtieran en 0,4 mg/ml y 0,6 % (v/v), respectivamente, se

añadieron en una cantidad de 50 µl/pocillo a los pocillos. Mientras la placa se incubaba mezclándose durante un tiempo, se llevaba a cabo una reacción de coloración. Posteriormente, se añadió HCl 1M a la placa (50 µl/pocillo) para terminar la reacción de coloración, y se midió la absorbancia a 490 nm usando un lector de placas (ENVISION: PerkinElmer). Para seleccionar los hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a GARP humana expresada en la superficie de una membrana celular, los hibridomas que produjeron un sobrenadante de cultivo que exhibe una absorbancia mayor en las células 293α transfectadas con el vector de expresión de GARP que la de las células transfectadas con el vector de control pcDNA3.1 (+) se seleccionaron como células positivas que producen el anticuerpo de GARP antihumano

5)-5 Cribado de anticuerpos de acuerdo con el método de la citometría de flujo

10 5)-5-1 Preparación de células que expresan el gen del antígeno para su uso en el análisis de la citometría de flujo

15 **[0252]** Las células HEK-293T (obtenidas a partir de ATCC) se sembraron en un matraz de 225 cm² (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) a 5×10^4 células/cm², y las células se cultivaron después en el medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS durante toda la noche en un 5 % de CO₂ a 37 °C. Al día siguiente, las células HEK-293T se transfectaron con un vector de expresión de GARP o un vector pcDNA3.1 (+) usado como un control negativo usando Lipofectamine 2000, y las células se incubaron además durante toda la noche en un 5 % de CO₂ a 37 °C. Al día siguiente, las células HEK-293T transfectadas se trataron con (Life Technologies), se lavaron con el medio DMEM suplementado con un 10 % de FBS y se volvieron a suspender en PBS suplementado con un 5 % de FBS. La suspensión celular obtenida se usó en un análisis de la citometría de flujo.

5)-5-2 Análisis de la citometría de flujo

20 **[0253]** La especificidad de unión a la GARP humana de un anticuerpo producido a partir de hibridomas que habían sido determinados como positivos mediante ELISA celular en el Ejemplo 5)-4-2 se confirmó además mediante un análisis de la citometría de flujo.

25 **[0254]** Se centrifugó una suspensión de las células HEK-293T de expresión transitoria preparadas en el Ejemplo 5)-5-1 y se eliminó el sobrenadante. Posteriormente, el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma se añadió a las células y se suspendió. Las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con un 5 % de FBS y, y se añadió a las células IgG antirrata conjugada con FITC (SIGMA) que se había diluido 500 veces con PBS suplementado con un 5 % de FBS y se suspendió. Las células se incubaron a 4 °C durante 1 hora. Las células se lavaron dos veces con PBS suplementado con 5 % de FBS y se volvieron a suspender después en PBS suplementado con 5 % de FBS y 2 µg/ml 7-aminoactinomicina D (Molecular Probes). Las células se midieron usando un citómetro de flujo (FC500: fabricado por Beckman Coulter). Los datos se analizaron usando Flowjo (TreeStar). Una vez eliminadas las células muertas del análisis separando las células positivas a la 7-aminoactinomicina D, se generó un histograma de la intensidad de fluorescencia FITC de las células vivas. Se seleccionaron los hibridomas que producen anticuerpos humanos de unión a GARP (113 clones) en función de los resultados en los que el histograma del anticuerpo se desplazaba hacia el lado de la intensidad de fluorescencia fuerte en las células HEK-293T transfectadas con el vector de expresión de GARP en comparación con las células transfectadas con el vector pcDNA3.1 de control.

5)-6 Preparación de un anticuerpo monoclonal

40 5)-6-1 Cultivo de hibridomas 151D y 198D

[0255] A partir de los hibridomas que producen anticuerpos de rata antihumanos de GARP obtenidos en la 5)-5-2 anterior, se seleccionaron los hibridomas 151D y 198D de los que se había sugerido que se unían fuertemente a la GARP humana.

45 **[0256]** Un anticuerpo monoclonal de rata anti-GARP se purificó a partir de un sobrenadante de cultivo de hibridoma.

50 **[0257]** En primer lugar, el volumen de los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de rata anti-GARP se incrementó suficientemente con Medio de selección ClonaCell-HY E y, a continuación, el medio se cambió por Hybridoma SFM (Life Technologies) al que se había añadido un 20 % de Ultra Low IgG FBS (Life Technologies). Posteriormente, los hibridomas (de 8 a 9×10^7 células) se sembraron en un matraz de 1272 cm² (Corning) y se cultivaron durante 7 días. El presente sobrenadante de cultivo se cosechó mediante centrifugación y se esterilizó pasándolo por un filtro de 0,8 µm y por un filtro de 0,45 µm (Corning).

5)-6-2 Purificación de un anticuerpo monoclonal

- 5 [0258] Se purificó un anticuerpo del sobrenadante de cultivo de los hibridomas preparados en el Ejemplo 5)-6-1 de acuerdo con cromatografía de afinidad de proteína G. El anticuerpo se adsorbió en una columna de proteína G (GE Healthcare Bioscience), la columna se lavó con PBS y el anticuerpo se eluyó con una solución acuosa de glicina/HCl 0,1 M (pH 2,7). Se añadió Tris-HCl 1 M (pH 9,0) al eluyente, de modo que el pH se ajustase a pH 7,0 a 7,5. Posteriormente, la solución se dializó (Thermo Scientific, Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), de manera que el tampón se sustituyese por PBS. Se concentró el anticuerpo usando el dispositivo de filtrado UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF30K, Sartorius), de manera que la concentración del anticuerpo se ajustase a 0,7 mg/mL o más. Por último, el anticuerpo se filtró a través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius) para obtener una muestra purificada.

Ejemplo 6: Clonación de anticuerpo de rata y producción de anticuerpo quimérico humano

6)-1 Clonación y secuenciación de ADNc de anticuerpo de rata 151D

6)-1-1 Preparación de ARN total a partir de hibridomas que producen 151D

- 15 [0259] Para amplificar el ADNc que comprende la región variable de 151D, el ARN total se preparó a partir de los hibridomas que producen 151D usando el reactivo TRIzol (Ambion).

6)-1-2 Amplificación de ADNc que comprende la región variable de cadena pesada 151D de acuerdo con PCR 5'-RACE y secuenciación del mismo

- 20 [0260] El ADNc que comprende la región variable de cadena pesada se amplificó usando aproximadamente 1 µg del total de ARN preparado en el Ejemplo 6)-1-1 y un kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE (Clontech).

- [0261] Como cebadores usados para amplificar el ADNc de la región variable de un gen de cadena pesada 151D de acuerdo con PCR, se usaron UPM (mezcla universal de cebadores A: incluida en el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE) y cebadores diseñados de las secuencias de las regiones constantes de las cadenas pesadas de ratas conocidas.

- 25 [0262] El ADNc que comprende la región variable de la cadena pesada amplificado por PCR 5'-RACE se clonó en un plásmido y, posteriormente, la secuencia de nucleótidos del ADNc de la región variable de cadena pesada se sometió a un análisis de secuencia.

- 30 [0263] La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada 151D se muestra en SEQ ID NO: 14 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 15.

6)-1-3 Amplificación del ADNc que comprende la región variable de cadena ligera 151D de acuerdo con PCR 5'-RACE y secuenciación del mismo

- 35 [0264] La amplificación y secuenciación se llevaron a cabo mediante el mismo método que el que se aplicó en el Ejemplo 6)-1-2. Sin embargo, como cebadores usados para amplificar el ADNc de la región variable de un gen de cadena ligera 151D de acuerdo con PCR, se usaron UPM (mezcla universal de cebadores A: incluida en el kit de amplificación de ADNc SMARTer RACE) y cebadores diseñados de las secuencias de las regiones constantes de las cadenas ligeras de ratas conocidas.

- 40 [0265] La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera 151D se muestra en SEQ ID NO: 16 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 17.

6)-2 Clonación y secuenciación de ADNc de anticuerpo de rata 198D

[0266] La amplificación se determinaron por el mismo método que el que se aplicó en el Ejemplo 6)-1.

- 45 [0267] La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada 198D se muestra en SEQ ID NO: 18 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 19. La secuencia de nucleótidos determinada del ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera 198D se muestra en SEQ ID NO: 20 y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 21.

6)-3 Producción de un vector de expresión de anticuerpo quimérico humano

6)-3-1 Construcción de un vector de expresión de cadena ligera quimérica humana pCMA-LK

5 [0268] Un fragmento de aproximadamente 5,4 kb, que se había obtenido digiriendo un plásmido pcDNA3.3-TOPO/LacZ (Invitrogen) con las enzimas de restricción XbaI y PmeI, se unió a un fragmento de ADN que comprendía la secuencia de señal de la cadena ligera humana mostrada en SEQ ID NO: 22 y una secuencia de ADN que codificaba una región constante de cadena k humana, usando un kit de clonación PCR In-Fusion Advantage (CLONTECH), para producir pcDNA3.3/LK.

[0269] Se eliminó una unidad de expresión de neomicina pcDNA3.3/LK para construir pCMA-LK.

6)-3-2 Construcción de un vector de expresión de la cadena pesada quimérica humana de tipo IgG1 pCMA-G1

10 [0270] Un fragmento de ADN, que se había obtenido digiriendo pCMA-LK con XbaI y PmeI para eliminar la secuencia de señal de la cadena ligera y la región constante de la cadena k humana del mismo, se unió a un fragmento de ADN que comprendía la secuencia de señal de la cadena pesada humana mostrada en SEQ ID NO: 23 y una secuencia de ADN que codifica los aminoácidos en una región constante humana IgG1, usando un kit de clonación PCR In-Fusion Advantage (CLONTECH), para construir pCMA-G1.

15 6)-3-3 Construcción de un vector de expresión de la cadena pesada quimérica humana 151D

20 [0271] Usando como plantilla elADNc que codifica la región variable de una cadena pesada del anticuerpo de rata 151D obtenido en el Ejemplo 6)-1, se llevó a cabo una PCR con cebadores diseñados para la clonación In-fusión, con el fin de amplificar un fragmento de ADN que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena pesada. Usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech), el fragmento de ADN amplificado se insertó en un sitio de pCMA-G1 que había sido escindido con la enzima de restricción BlnI, con el fin de construir un vector de expresión de cadena pesada quimérica humana 151D.

[0272] La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada quimérica humana 151D y la secuencia de aminoácidos de esta cadena pesada se muestran en SEQ ID NO: 24 y SEQ ID NO: 25, respectivamente.

25 6)-3-4 Construcción de un vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 151D

30 [0273] Usando como plantilla, elADNc que codifica la región variable de una región variable de cadena ligera 151D obtenido en el Ejemplo 6)-1, se llevó a cabo una PCR con cebadores diseñados para la clonación In-fusión, con el fin de amplificar un fragmento de ADN que comprende el ADNc que codifica la región variable de cadena ligera. Usando un kit de clonación In-Fusion HD PCR (Clontech), el fragmento de ADN amplificado se insertó en un sitio de pCMA-LK que había sido escindido con la enzima de restricción BsiWI, con el fin de construir un vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 151D.

[0274] La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera quimérica humana 151D y la secuencia de aminoácidos de esta cadena ligera se muestran en SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 27, respectivamente.

35 6)-3-5 Construcción de un vector de expresión de cadena pesada quimérica humana 198D

[0275] Usando como plantilla, elADNc que codifica la región variable de una cadena pesada de anticuerpo de rata 198D obtenido en el Ejemplo 6)-2, se construyó un vector de expresión de cadena pesada quimérica humana 198D mediante el mismo método que el que se aplicó en el Ejemplo 6)-3-3.

40 [0276] La secuencia de nucleótidos de la cadena pesada quimérica humana 198D y la secuencia de aminoácidos de esta cadena pesada se muestran en SEQ ID NO: 28 y SEQ ID NO: 29, respectivamente.

6)-3-6 Construcción de un vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 198D

45 [0277] Usando como plantilla, elADNc que codifica la región variable de una cadena ligera 198D obtenido en el Ejemplo 6)-2, se construyó un vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 198D mediante el mismo método que el que se aplicó en el Ejemplo 6)-3-4.

[0278] La secuencia de nucleótidos de la cadena ligera quimérica humana 198D y la secuencia de aminoácidos de esta cadena ligera se muestran en SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 31, respectivamente.

6)-4 Preparación de un anticuerpo quimérico humano

6) -4 -1 Producción de un anticuerpo quimérico humano

[0279] De acuerdo con el manual, las células FreeStyle 293F (Invitrogen) se cultivaron y pasificaron células. Se sembraron 1×10^8 células FreeStyle 293F (Invitrogen) en la fase de crecimiento logarítmico en un matraz Fernbach Erlenmeyer de 250 ml (CORNING) y, a continuación, se diluyeron con un medio de expresión FreeStyle293 (Invitrogen) a $2,0 \times 10^6$ células/mL.

[0280] Mientras tanto, se añadieron 20 µg del vector de expresión de cadena pesada, 30 µg del vector de expresión de cadena ligera y 150 µg de polietileneimina (Polyscience #24765) a 5 mL del medio Opti-Pro SFM (Invitrogen), y la mezcla obtenida se agitó suavemente. Después de la incubación durante 5 minutos, la mezcla se añadió a las células FreeStyle 293F.

[0281] Las células se incubaron en una incubadora (37 °C, 8 % de CO₂) con agitación a 125 rpm durante 4 horas y, a continuación, se añadieron al cultivo 50 mL del medio EX-CELL VPRO (SAFC Biosciences), 0,36 mL de GlutaMAX I (GIBCO) y 2,5 mL de ultrafiltrado de Yeastolate (GIBCO). Las células se incubaron además en una incubadora (37 °C, 8 % de CO₂) con agitación a 125 rpm durante 7 días. Se cosechó el sobrenadante del cultivo y se filtró con un sistema de filtrado de 250 ml (CORNING, núm. 431096).

[0282] Un anticuerpo quimérico humano 151D obtenido por la combinación del vector de expresión de cadena pesada quimérica humana 151D con el vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 151D se denominó "c151D", mientras que un anticuerpo quimérico humano 198D obtenido por la combinación del vector de expresión de cadena pesada quimérica humana 198D con el vector de expresión de cadena ligera quimérica humana 198D se denominó "c198D".

6)-4-2 Purificación de un anticuerpo quimérico

[0283] El sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 6)-4-1 se purificó mediante un proceso de cromatografía de afinidad de rProteína A de una etapa. El sobrenadante del cultivo se aplicó a una columna (fabricada por GE Healthcare Bioscience) que se había llenado con MabSelectSuRe equilibrada con PBS, y a continuación se lavó la columna con PBS en una cantidad igual o superior a dos veces el volumen de la columna. Posteriormente, la elución se llevó a cabo usando una solución de clorhidrato de arginina 2 M (pH 4,0), de manera que se recogiera una fracción que contuviera un anticuerpo. Esta fracción se sometió al dispositivo de filtrado UF centrífugo VIVASPIN20 (corte de peso molecular: UF30K, Sartorius), de manera que el tampón se sustituyese por PBS y el anticuerpo se concentrase, ajustando así la concentración de anticuerpo a 1 mg/mL o más. Por último, el anticuerpo se filtró través de un filtro Minisart-Plus (Sartorius) para obtener una muestra purificada.

6)-5 Evaluación de la actividad de unión de un anticuerpo quimérico humano a GARP humana

[0284] Se evaluó la constante de disociación entre el c151D o c198D producido en el Ejemplo 6)-4 y la GARP humana usando Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience), de acuerdo con un método de captura, que comprende capturar el anticuerpo como un ligando con la proteína A inmovilizada y luego analizar la constante de disociación usando un antígeno (GARP humana recombinante: R&D Systems) como un analito. Se usó HBS-EP+ (fabricado por GE Healthcare Bioscience) como tampón de funcionamiento, y un chip sensor de proteína A (fabricado por GE Healthcare Bioscience) como un chip sensor.

[0285] El anticuerpo quimérico humano (1 µg/mL) se añadió al chip a una velocidad de 10 µl/min durante 20 segundos, y a continuación se añadió una solución en serie de dilución (8 a 128 nM) del antígeno a una velocidad del flujo de 30 µl/min durante 120 segundos. Posteriormente, la disociación se monitorizó durante 480 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió glicina 1,5 (fabricada por GE Healthcare Bioscience) a una velocidad del flujo de 20 µl/min durante 30 segundos.

[0286] 1 : 1 En el análisis de datos se usaron modelos de ajuste y se calcularon la constante de la tasa de asociación k_a , la constante de la tasa de disociación k_d y la constante de disociación (KD; $KD = k_d/k_a$).

[0287] Los resultados se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Constante de disociación entre c151D o c198D y GARP humana

[0288]

[Tabla 1]		
	Nombre	KD (nM)
1	c151D	0,47

2	c198D	0,17
---	-------	------

Ejemplo 7 Producción de anticuerpo humanizado

7)-1 Modelado molecular la región variable del anticuerpo c151D

5 **[0289]** El modelado molecular de la región variable del anticuerpo c151D se llevó a cabo de acuerdo con un método que se había conocido generalmente como modelado homólogo (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991))

10 **[0290]** Se comparó la secuencia primaria de la región variable de una inmunoglobulina humana registrada en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res.28, 235-242 (2000)) (una estructura tridimensional inferida a partir de una estructura cristalina de rayos X está disponible) con la región variable del anticuerpo c151D.

15 **[0291]** La estructura tridimensional de la región variable se produjo combinando, entre sí, las coordenadas de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo c151D y un modelo que presenta una homología alta de secuencia con las interfaces, con el fin de obtener un "modelo marco".

20 **[0292]** Después de ello, se introdujo la conformación representativa de cada CDR en el modelo marco.

[0293] Finalmente, para eliminar el contacto atómico que es desventajoso en términos de energía, se llevó a cabo un cálculo de minimización de energía. Los procedimientos descritos anteriormente se llevaron a cabo usando Discovery Studio (Dassault Systemes).

20 7)-2 Diseño de secuencia de aminoácidos de 151D humana

[0294] Un anticuerpo humanizado 151D se construyó de acuerdo con un método generalmente conocido como injerto CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor en función de la homología de aminoácidos en la región marco.

25 **[0295]** La secuencia de la región marco del anticuerpo c151D se comparó con la región marco de una secuencia consenso de un subgrupo humano determinada por KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Como resultado, la secuencia consenso del subgrupo 3 de la cadena γ humana y de los subgrupos 1 y 4 de la cadena κ humana tuvo una homología alta de secuencias y, en función de esto, se seleccionaron como aceptores.

30 **[0296]** Con respecto a la secuencia consenso del subgrupo 3 de la cadena γ humana y las secuencias consenso del subgrupo 1 de la cadena κ humana y el subgrupo 4 de la cadena κ humana, los residuos de aminoácidos en las regiones marco se alinearon con los residuos de aminoácidos del anticuerpo c151D, de manera que se identificaran las posiciones, en las que se usaban diferentes aminoácidos. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando el modelo tridimensional del anticuerpo c151D construido en la 7)-1 anterior y los residuos donantes que se van a injertar en el aceptor se seleccionaron en función de los criterios dados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

35 **[0297]** Los residuos donantes seleccionados de esta forma se introdujeron en un anticuerpo aceptor, para construir la secuencia del h151D humanizado de la forma descrita en los siguientes ejemplos.

40 7)-3 Diseño de la cadena pesada 151D humanizada h151D-H

7)-3-1 Cadena pesada de anticuerpos de tipo h151D- H1

45 **[0298]** Una cadena pesada humanizada 151D diseñada sustituyendo el residuo de arginina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de glicina, el residuo de lisina en la posición de aminoácido 37 con un residuo de leucina, el residuo de lisina en la posición de aminoácido 38 con un residuo de arginina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de alanina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, el residuo de glutamina en la posición 62 con un residuo de lisina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 68 con un residuo de serina, el residuo de arginina en la posición de aminoácido 80 con un residuo de alanina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de serina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 96 con un residuo de asparagina, el residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido 103 con un residuo de asparagina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de alanina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 112 con un residuo de valina, el residuo de valina en la posición de aminoácido 130 con un residuo de treonina y el residuo de metionina en la

posición de aminoácido 131 con un residuo de leucina en la cadena pesada c151D que se muestra en SEQ ID NO: 25 en la lista de secuencias, se denominó "cadena pesada de tipo h151D-H1".

- 5 **[0299]** En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 32) que codifica la cadena pesada de tipo h151D-H1, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 409 a la 1398. La región variable mencionada anteriormente tiene la
- 10 secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 133 a la 162 que codifica CDRH1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 205 a la 234 que codifica CDRH2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 352 a la 375 que codifica CDRH3 en SEQ ID NO: 32 en la lista de secuencias.
- 15 **[0300]** Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 33) de la cadena pesada de tipo h151D-H1, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 y la región constante está la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos
- 20 de la 137 a la 466. La región variable mencionada anteriormente tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 45 a la 54 en SEQ ID NO: 33 en la lista de secuencias, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 69 a la 78 en la misma y CDHR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de la 118 a la 125 en la misma.
- 25 **[0301]** Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 32 y 33 también se muestran en las Figuras 31 y 21, respectivamente.

7)-3-2 Cadena pesada de tipo h151D_H4

- 30 **[0302]** Una cadena pesada humanizada 151D diseñada sustituyendo el residuo de arginina en la posición del aminoácido 35 con un residuo de glicina, el residuo de lisina en la posición de aminoácido 37 con un residuo de leucina, el residuo de lisina en la posición de aminoácido 38 con un residuo de arginina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de alanina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, el residuo de glutamina en la posición 62 con un residuo de lisina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de serina, el residuo de ácido aspártico en la posición de aminoácido
- 35 103 con un residuo de asparagina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 107 con un residuo de alanina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 112 con un residuo de valina, el residuo de valina en la posición de aminoácido 130 con un residuo de treonina y el residuo de metionina en la posición de aminoácido 131 con un residuo de leucina en la cadena pesada c151D que se muestra en SEQ ID NO: 25 en la lista de secuencias, se denominó "cadena pesada de tipo h151D_H4".
- 40 **[0303]** En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 34) que codifica la cadena pesada de tipo h151D-H4, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos
- 45 en las posiciones de nucleótidos de la 409 a la 1398. La región variable mencionada anteriormente tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 133 a la 162 que codifica CDRH1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 205 a la 234 que codifica CDRH2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 352 a la 375 que codifica CDRH3 en SEQ ID NO: 34 en la lista de secuencias.
- 50 **[0304]** Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 35) de la cadena pesada de tipo h151D-H4, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 y la región
- 55 constante es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 137 a la 466. La región variable mencionada anteriormente tiene CDRH1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 45 a la 54 en SEQ ID NO: 35 en la lista de secuencias, CDRH2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 69 a la 78 en la misma y CDHR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de la 118 a la 125 en la misma.
- 60 **[0305]** Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 34 y 35 también se muestran en las Figuras 33 y 23, respectivamente.

7)-4 Diseño de la cadena ligera 151D humanizada h151D_L

7)-4-1 Cadena ligera de tipo h151D- L1

- [0306]** Una cadena ligera humanizada 151D diseñada sustituyendo el residuo de treonina en la posición de aminoácido 29 con un residuo de ácido aspártico, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 31 con un residuo de leucina, el residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de alanina, el residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 33 con un residuo de valina, el residuo de valina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de leucina, el residuo de ácido aspártico en la posición 37 con un residuo de ácido glutámico, el residuo de valina en la posición de aminoácido 39 con un residuo de alanina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 41 con un residuo de isoleucina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 60 con un residuo de prolina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 83 con un residuo de serina, el residuo de asparagina en la posición de aminoácido 97 con un residuo de serina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 98 con un residuo de leucina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 103 con un residuo de valina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, el residuo de asparagina en la posición de aminoácido 127 con un residuo de lisina y el residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina en la cadena ligera c151D que se muestra en SEQ ID NO: 27 en la lista de secuencias, se denominó "cadena pesada de tipo h151D_L1".
- [0307]** En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 36) que codifica la cadena ligera de tipo h151D-L1, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702. La región variable mencionada anteriormente tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 130 a la 162 que codifica CDRH1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 208 a la 228 que codifica CDRH2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 325 a la 351 que codifica CDRH3 en SEQ ID NO: 36 en la lista de secuencias.
- [0308]** Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 37) de la cadena ligera de tipo h151D_L1, la cadena ligera madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 y la región constante es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 130 a la 234. La región variable mencionada anteriormente tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 44 a la 54 en SEQ ID NO: 37 en la lista de secuencias, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 70 a la 76 en la misma y CDHR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de la 109 a la 117 en la misma.
- [0309]** Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 36 y 37 también se muestran en las Figuras 32 y 22, respectivamente.

7)-4-2 Cadena ligera de tipo h151D- L4:

- [0310]** Una cadena ligera humanizada 151D diseñada sustituyendo el residuo de treonina en la posición de aminoácido 29 con un residuo de serina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 31 con un residuo de leucina, el residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de serina, el residuo de isoleucina en la posición de aminoácido 33 con un residuo de alanina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 41 con un residuo de isoleucina, el residuo de treonina en la posición 60 con un residuo de prolina, el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 62 con un residuo de lisina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 83 con un residuo de serina, el residuo de asparagina en la posición de aminoácido 97 con un residuo de serina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 98 con un residuo de leucina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 103 con un residuo de fenilalanina, el residuo de valina en la posición de aminoácido 105 con un residuo de treonina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 126 con un residuo de isoleucina, el residuo de asparagina en la posición de aminoácido 127 con un residuo de lisina y el residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina en la cadena ligera c151D que se muestra en SEQ ID NO: 27 en la lista de secuencias, se denominó "cadena ligera de tipo h151D-L4".

[0311] En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 38) que codifica la cadena ligera de tipo h151D-L4, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702. La región variable mencionada anteriormente tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 130 a la 162 que codifica CDRL1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 208 a la 228 que codifica CDRL2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 325 a la 351 que codifica CDRL3 en SEQ ID NO: 38 en la lista de secuencias.

[0312] Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 39) de la cadena ligera de tipo h151D_L4, la cadena ligera madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 y la región constante es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 130 a la 234. La región variable mencionada anteriormente tiene CDRL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 44 a la 54 en SEQ ID NO: 39 en la lista de secuencias, CDRL2 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 70 a la 76 en la misma y CDHR3 que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de la 109 a la 117 en la misma.

[0313] Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 38 y 39 también se muestran en las Figuras 34 y 24, respectivamente.

7)-5 Modelado molecular la región de variación de c198D

[0314] El modelado molecular de la región variable del anticuerpo c198D se llevó a cabo de acuerdo con un método había conocido generalmente como modelado homólogo (Methods in Enzymology, 203, 121-153, (1991)). Se comparó la secuencia primaria de la región variable de una inmunoglobulina humana registrada en Protein Data Bank (Nuc. Acid Res.28, 235-242 (2000)) (una estructura tridimensional inferida a partir de una estructura cristalina de rayos X está disponible) con la región variable del anticuerpo c198D.

[0315] La estructura tridimensional de la región variable se produjo combinando, entre sí, las coordenadas de la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo c198D y un modelo que presenta una homología alta de secuencia con sus interfaces, con el fin de obtener un "modelo marco".

[0316] Después de ello, se introdujo la conformación representativa de cada CDR en el modelo marco.

[0317] Finalmente, para eliminar el contacto atómico que es desventajoso en términos de energía, se llevó a cabo un cálculo de minimización de energía. Los procedimientos descritos anteriormente se llevaron a cabo usando Discovery Studio (Dassault Systemes).

7)-6 Diseño de secuencia de aminoácidos de 198D humana

[0318] Un anticuerpo humanizado 198D se construyó de acuerdo con un método generalmente conocido como injerto CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)). Se seleccionó un anticuerpo aceptor en función de la homología de aminoácidos en la región marco.

[0319] La secuencia de la región marco del anticuerpo c198D se comparó con la región marco de una secuencia consenso de un subgrupo humano determinada por KABAT et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Como resultado, la secuencia consenso del subgrupo 2 de la cadena γ humana y del subgrupo 1 de la cadena κ humana tuvieron una homología alta de secuencias y, en función de esto, se seleccionaron como un aceptor. Además, varios residuos en la secuencia consenso del subgrupo 3 de cadena γ humana se introdujeron en el aceptor de la cadena pesada.

[0320] Con respecto a la secuencia consenso del subgrupo 2 de la cadena γ humana que comprende una porción de la secuencia consenso del subgrupo 3 de la cadena γ humana y la secuencia consenso del subgrupo 1 de la cadena κ humana, los residuos de aminoácidos en las regiones marco se alinearon con los residuos de aminoácidos del anticuerpo c198D, de manera que se identificaran las posiciones en las que se usaban diferentes aminoácidos. Las posiciones de estos residuos se analizaron usando un modelo tridimensional del anticuerpo c198D construido en la 7)-5 anterior y los residuos donantes que se van a injertar en el aceptor se seleccionaron en función de los criterios dados por Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033 (1989)).

[0321] Los varios residuos donantes seleccionados de esta forma se introdujeron en el anticuerpo aceptor para construir la secuencia del h198D humanizado de la forma descrita en los siguientes ejemplos.

7)-7 Diseño de la cadena pesada 198D humanizada h198D-H

5 7)-7-1 Cadena pesada de tipo h198D- H3

[0322] Una cadena ligera humanizada 198D diseñada sustituyendo el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 20 con un residuo de ácido glutámico, el residuo de arginina en la posición de aminoácido 24 con un residuo de valina, el residuo de prolina en la posición de aminoácido 28 con un residuo de glicina, el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 32 con un residuo de lisina, el residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 61 con un residuo de glicina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 80 con un residuo de prolina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 81 con un residuo de serina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 86 con un residuo de valina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 87 con un residuo de treonina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 95 con un residuo de asparagina, el residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 98 con un residuo de serina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 101 con un residuo de leucina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 103 con un residuo de serina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 104 con un residuo de valina, el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 105 con un residuo de treonina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 106 con un residuo de alanina, el residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 107 con un residuo de alanina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 111 con un residuo de valina, el residuo de fenilalanina en la posición de aminoácido 113 con un residuo de tirosina, el residuo de alanina en la posición de aminoácido 133 con un residuo de treonina, y el residuo de serina en la posición de aminoácido 134 con un residuo de leucina, en la cadena ligera c198D que se muestra en SEQ ID NO: 29 en la lista de secuencias, se denominó "cadena ligera de tipo h198D_H3".

[0323] En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 40) que codifica la cadena pesada de tipo h198D-H3, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1407, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 417 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 418 a la 1407. La región variable mencionada anteriormente tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 130 a la 162 que codifica CDRH1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 205 a la 231 que codifica CDRH2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 349 a la 384 que codifica CDRH3 en SEQ ID NO: 40 en la lista de secuencias.

[0324] Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 41) de la cadena pesada de tipo h198D-H3, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 469, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 139 y la región constante es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 140 a la 469.

[0325] Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 40 y 41 también se muestran en las Figuras 35 y 25, respectivamente.

45 7)-8 Diseño de la cadena ligera 198D humanizada h198D-L

7)-8-1 Cadena ligera de tipo h198D- L4

[0326] Una cadena ligera humanizada 198D diseñada sustituyendo el residuo de alanina en la posición de aminoácido 29 con un residuo de serina, el residuo de glicina en la posición de aminoácido 33 con un residuo de alanina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 35 con un residuo de valina, el residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 37 con un residuo aspártico, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 38 con un residuo de arginina, el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 42 con un residuo de treonina, el residuo de glutamina en la posición de aminoácido 65 con un residuo de lisina, el residuo de glicina en la posición de aminoácido 85 con un residuo de serina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 92 con un residuo de treonina, el residuo de lisina en la posición de aminoácido 94 con un residuo de treonina, el residuo de metionina en la posición de aminoácido 98 con un residuo de leucina, el residuo de treonina en la posición de aminoácido 100 con un residuo de prolina, el residuo de ácido glutámico en la posición de aminoácido 103 con un residuo de fenilalanina, el residuo de glicina en la posición de aminoácido 104 con un residuo de

alanina, el residuo de valina en la posición de aminoácido 105 con un residuo de treonina, el residuo de serina en la posición de aminoácido 120 con un residuo de glutamina, el residuo de leucina en la posición de aminoácido 124 con un residuo de valina y el residuo de alanina en la posición de aminoácido 129 con un residuo de treonina en la cadena ligera c198D que se muestra en SEQ ID NO: 31 en la lista de secuencias, se denominó "cadena ligera de tipo h198D-L4".

[0327] En la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 42) que codifica la cadena ligera de tipo h198D-L4, la cadena pesada madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702, la región variable está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 y la región constante está codificada por la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 388 a la 702. La región variable mencionada anteriormente tiene la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 130 a la 162 que codifica CDRL1, la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 208 a la 228 que codifica CDRL2 y la secuencia de nucleótidos que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 325 a la 351 que codifica CDRL3 en SEQ ID NO: 42 en la lista de secuencias.

[0328] Además, en la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 43) de la cadena ligera de tipo h198D-L4, la cadena ligera madura, de la que se ha eliminado una secuencia de señal, es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234, la región variable es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 y la región constante es la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 130 a la 234.

[0329] Además, las secuencias que se muestran en SEQ ID NO: 42 y 43 también se muestran en las Figuras 36 y 26, respectivamente.

7)-9 Construcción de un vector de expresión para anticuerpo humanizado

7)-9-1 Construcción del vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1

[0330] Un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de tipo h151D-H1 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 de la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo h151D-H1 que se muestra en SEQ ID NO: 32 en la lista de secuencias se sintetizó (GENEART, servicio de síntesis de genes artificiales). Se construyó un vector de expresión para la cadena pesada de tipo h151D-H1 usando el fragmento de ADN sintetizado de acuerdo con los protocolos de la tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza. El vector de expresión construido se denominó "GSV-h151D-H1."

[0331] Un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera de tipo h151D-L1 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo h151D-L1 que se muestra en SEQ ID NO: 36 en la lista de secuencias se sintetizó (GENEART, servicio de síntesis de genes artificiales).

[0332] Se construyó un vector de expresión para la cadena ligera de tipo h151D-L1 usando el fragmento de ADN sintetizado de acuerdo con los protocolos de la tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza. El vector de expresión construido se denominó "GSV-h151D-L1."

[0333] Posteriormente, se construyó un vector de expresión MACA-1511a a partir de los vectores de expresión construidos de esta forma "GSV-h151D-H1" y "GSV-h151D-L1" de acuerdo con los protocolos de la tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza. El vector de expresión obtenido se denominó "DGV-h151D-H1L1-GS".

7)-9-2 Construcción del vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4

[0334] Como en el caso del Ejemplo 7)-9-1, se sintetizaron un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de tipo h151D-H4 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 de la secuencia de nucleótidos de una cadena pesada de tipo h151D-H4 que se muestra en SEQ ID NO: 34 en la lista de secuencias y un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera de tipo h151D-L4 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo h151D-L4 que se muestra en SEQ ID NO: 38 en la lista de secuencias (GENEART, servicio de síntesis de genes artificiales).

[0335] Se construyó un vector de expresión MACA-1514a usando los fragmentos de ADN sintetizados de acuerdo

con los protocolos de la tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza. El vector de expresión obtenido se denominó "DGV-h151D-H4L4-GS".

7)-9-3 Construcción del vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4

5 **[0336]** Como en el caso del Ejemplo 7)-9-1, se sintetizaron un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena pesada de tipo h198D-H3 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1407 de la secuencia de nucleótidos de la cadena pesada de tipo h198D-H3 que se muestra en SEQ ID NO: 40 en la lista de secuencias y un fragmento de ADN que comprende una secuencia que codifica la cadena ligera de tipo h198D-L4 que consiste en los nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 de la secuencia de nucleótidos de la cadena ligera de tipo h198D-L4 que se muestra en SEQ ID NO: 42 en la lista de secuencias (GENEART, servicio de síntesis de genes artificiales).

10 **[0337]** Se construyó un vector de expresión MACA-1983a usando los fragmentos de ADN sintetizados de acuerdo con los protocolos de la tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza. El vector de expresión obtenido se denominó "DGV-h198D-H3L4-GS".

15 7)-10 Preparación de un anticuerpo

7)-10-1 Producción de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado

7) -10 -1-1 Producción de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1

20 **[0338]** Las células Potelligent CHOK1SV (BioWa y Lonza) se transfectaron con el vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1, DGV-h151D-H1L1-GS, que se había construido en el Ejemplo 7)-9-1 de acuerdo con los protocolos de la Tecnología Potelligent(R) CHOK1SV de BioWa y Lonza, para construir una línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1. La línea celular productora obtenida se denominó "MAC1-1".

7) -10 -1-2 Producción de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4

25 **[0339]** Como en el caso del Ejemplo 7)-10-1-1, las células Potelligent CHOK1SV (BioWa y Lonza) se transfectaron con el vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4, DGV-h151D-H4L4-GS, que se había construido en el Ejemplo 7)-9-2 para construir una línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4. La línea celular productora obtenida se denominó "MAC2-1".

7) -10 -1-3 Producción de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4

30 **[0340]** Como en el caso del Ejemplo 7)-10-1-1, las células Potelligent CHOK1SV (BioWa y Lonza) se transfectaron con el vector de expresión del anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4, DGV-h198D-H3L4-GS, que se había construido en el Ejemplo 7)-9-3 para construir una línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4. La línea celular obtenida se denominó "MAC3-1".

7)-10-2 Cultivo de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado

7) -10 -2-1 Cultivo de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1

35 **[0341]** La línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1 "MAC1-1" producida en el Ejemplo 7)-10-1-1 se cultivó usando un aparato de cultivo Wave reactor (GE Healthcare Japan). La línea celular productora "MAC1-1" se descongeló en un medio Dsp04B (JX Energy) y, después, se cultivó en medio Dsp04B (JX Energy) a 120 rpm en una incubadora (37 °C, 5 % de CO₂). La solución de cultivo obtenida se diluyó con el medio C36 (JX Energy) y, después, se cultivó expansivamente a 120 rpm en una incubadora (37 °C, 5 % de CO₂).

40 **[0342]** La solución de cultivo obtenida se diluyó con el medio C36 a 30×10^4 células/mL, y, después, se transfirió a una WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), realizándose, a continuación, un cultivo a 37 °C en un 5 % de CO₂, a una tasa de suministro de aire de 0,3 L/min, a una tasa de rotación de 18-24 rpm, con un ángulo de 6-8° durante 13 días.

45 **[0343]** A partir del tercer día después de la iniciación del cultivo, el medio FM4Ae2 (autopreparado) se añadió al

cultivo en una cantidad del 6 % del volumen del cultivo inicial por día. La solución de cultivo obtenida se filtró aproximadamente a través de un filtro de profundidad Millistak MC0HC054H1 (Merck Millipore), y, después, se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Sartorius) acoplado a Flexboy Bag El filtrado se denominó "sobrenadante de cultivo MACA-1511a".

5 7)-10 -2-2 Cultivo de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4

[0344] De la misma manera que se aplicó en el Ejemplo 7)-10-2-1, la línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4 "MAC2-1» producida en el Ejemplo 7)-10-1-2 se cultivó y expandió y, después, las células se sometieron a un cultivo por lotes alimentado usando un reactor de cultivo Wave (GE Healthcare Japan). El cultivo obtenido se diluyó con el medio C36 a 30×10^4 células/mL, y, después, se transfirió a una WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), realizándose a continuación un cultivo durante 13 días. La solución de cultivo obtenida se filtró y el filtrado obtenido se denominó "sobrenadante de cultivo MACA-1514a".

7)-10 -2-3 Cultivo de células que producen el anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4

[0345] De la misma manera que se aplicó en el Ejemplo 7)-10-2-1, la línea celular que produce el anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4 "MAC3-1» producida en el Ejemplo 7)-10-1-3 se cultivó y expandió y, después, las células se sometieron a un cultivo por lotes alimentado usando un reactor de cultivo Wave (GE Healthcare Japan). El cultivo obtenido se diluyó con el medio C36 a 30×10^4 células/mL, y, después, se transfirió a una WAVE CELLBAG (GE Healthcare Bioscience), realizándose a continuación un cultivo durante 13 días. La solución de cultivo obtenida se filtró y el filtrado obtenido se denominó "sobrenadante de cultivo MACA-1983a".

7)-10-3 Preparación de un anticuerpo GARP antihumano humanizado

20 7)-10-3-1 Purificación de un anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H1L1

[0346] El "sobrenadante de cultivo MACA-1511a" obtenido en el Ejemplo 7)-10-2-1 se purificó mediante un proceso de tres etapas, en concreto, mediante cromatografía de afinidad de rProteína A, cromatografía de intercambio de aniones y cromatografía de intercambio de cationes.

[0347] En primer lugar, el sobrenadante de cultivo se aplicó a una resina cromatográfica de afinidad de rProteína A que se había equilibrado con PBS. Una vez que toda la solución de cultivo había entrado en la columna, la columna se lavó con PBS, un tampón que contenía arginina y PBS. Posteriormente, la sustancia restante en la columna se eluyó con un tampón de acetato, y, a continuación, se recogió un pico de absorción a 280 nm. La solución recogida se neutralizó con un tampón Tris y se filtró aproximadamente a través de un filtro de fibra de vidrio AP20 (Merck Millipore). La solución se filtró a través de Stericup-GV (Merck Millipore) que era un filtro de 0,22-µm, y el filtrado resultante se definió como un conjunto purificado de rProteína A.

[0348] Posteriormente, el conjunto purificado de rProteína A se aplicó a una resina cromatográfica de intercambio de aniones que se había equilibrado con PBS. Después de que la solución aplicada en su conjunto hubiera entrado en la columna, se suministró PBS. Se recogió una fracción de flujo y el pico de absorción a 280 nm en el momento del suministro de PBS. El pH de la solución recogida se ajustó con ácido acético y la solución se filtró aproximadamente a través de un filtro de fibra de vidrio AP20 (Merck Millipore). La solución se filtró a través de Stericup-GV (Merck Millipore) que era un filtro de 0,22-µm, y el filtrado resultante se definió como un conjunto purificado de AEX.

[0349] Posteriormente, el conjunto purificado de AEX se aplicó a una resina cromatográfica de intercambio de cationes que se había equilibrado con un tampón de acetato. Después de que la solución aplicada en su conjunto hubiera entrado en la columna, la columna se lavó con un tampón de acetato. Después, la elución se llevó a cabo usando un tampón de acetato que contenía una alta concentración de NaCl, y se recogió el pico de absorción a 280 nm. La solución recogida se filtró aproximadamente a través de un filtro de fibra de vidrio AP20 (Merck Millipore) y, después, se filtró a través de Stericup-GV (Merck Millipore) que era un filtro de 0,22-µm. El filtrado resultante se definió como un conjunto purificado de CEX.

[0350] El conjunto purificado de CEX se concentró a una concentración de anticuerpo de 25 mg/mL con Pellicon 3 Cassette 30 kDa (Merck Millipore), y, después, se sustituyó el tampón por un tampón de histidina (25mM de histidina, 5 % de sorbitol, pH 6,0). Finalmente, la solución se filtró aproximadamente a través de un filtro de fibra de vidrio AP20 (Merck Millipore) y, después, se filtró a través de Stericup-GV (Merck Millipore) que era un filtro de 0,22-µm, para obtener una muestra purificada. Esta muestra purificada se denominó "h151D-H1L1".

7)-10-3-2 Purificación de un anticuerpo GARP antihumano humanizado h151D-H4L4

[0351] De la misma manera que se aplicó en el Ejemplo 7)-10-3-1, el "sobrenadante de cultivo MACA-1514a" obtenido en el Ejemplo 7)-10-2-2 se purificó mediante un proceso de tres etapas, en concreto, mediante cromatografía de afinidad de rProteína A, cromatografía de intercambio de aniones y cromatografía de intercambio de cationes. La muestra purificada se denominó "h151D-H4L4".

5 7)-10-3-3 Purificación de un anticuerpo GARP antihumano humanizado h198D-H3L4

[0352] De la misma manera que se aplicó en el Ejemplo 7)-10-3-1, el "sobrenadante de cultivo MACA-1983at" obtenido en el Ejemplo 7)-10-2-3 se purificó mediante un proceso de tres etapas, en concreto, mediante cromatografía de afinidad de rProteína A, cromatografía de intercambio de aniones y cromatografía de intercambio de cationes. La muestra purificada se denominó "h198D-H3L4".

10 7)-11 Evaluación de la actividad de unión de los anticuerpos GARP antihumanos humanizados a GARP humana

[0353] Se evaluó la constante de disociación entre cada uno de los anticuerpos GARP antihumanos humanizados h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 producidos en el Ejemplo 7)-10 y la GARP usando Biacore T200 (GE Healthcare Bioscience), de acuerdo con un método de captura, que comprende capturar el anticuerpo como un ligando por la proteína A inmovilizada y después analizar la constante de disociación usando un antígeno como un analito. Se usó HBS-EP+ (fabricado por GE Healthcare Bioscience) como tampón de funcionamiento, y un chip sensor de proteína A (fabricado por GE Healthcare Bioscience) como un chip sensor.

[0354] El anticuerpo quimérico humano (1 µg/mL) se añadió al chip a una velocidad de 10 µl/min durante 20 segundos, y se añadió una solución en serie de dilución (8 a 128 nM) del antígeno a una velocidad del flujo de 30 µl/min durante 120 segundos. Posteriormente, la disociación se monitorizó durante 480 segundos. Como una solución de regeneración, se añadió glicina 1,5 (fabricada por GE Healthcare Bioscience) a una velocidad del flujo de 20 µl/min durante 30 segundos.

[0355] 1 : 1 En el análisis de datos, se usó un modelo de ajuste y se calcularon la constante de la tasa de asociación k_a , la constante de la tasa de disociación k_d y la constante de disociación (KD; $KD = k_d/k_a$).

[0356] Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 Constante de disociación de anticuerpos GARP antihumanos humanizados

[0357]

30

[Tabla 2]

	Nombre	KD (nM)
1	h151D-H1L1	1,8
2	h151D-H4L4	1,2
3	h198D-H3L4	0,088

Ejemplo 8: Unión a células que expresan el gen del antígeno 8)-1 Unión a GARP

[0358] De acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 2, se preparó una suspensión de células HEK-293T en las que se había transfectado un vector de expresión de GARP humana o un vector de control. Se añadieron h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4 e IgG humana de control (IgG humana: Eureka Therapeutics) a la suspensión celular, y las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos.

[0359] Las células se lavaron dos veces con tampón FACS (PBS (Invitrogen) suplementado con un 3 % de FBS) y, a continuación, se añadieron y suspendieron los anticuerpos anti-IgG marcados con R-ficoeritrina (PE) (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y Horizon FVS450 (Becton Dickinson). Las células se incubaron además a 4 °C durante 15 minutos. El análisis de la citometría de flujo se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 2, y se generó un histograma de la intensidad de fluorescencia PE (Figura 37).

[0360] Los histogramas de intensidad de fluorescencia para h151D-H1L1, h151D-H4L4, y h198D-H3L4 en las células HEK-293T transfectadas con el vector de control fueron similares al histograma para IgG de control (en la figura, las células se denominan "HEK-293T transfectadas con vector de prueba").

[0361] Por otro lado, se confirmó que los histogramas de intensidad de fluorescencia para h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se desplazaron hacia el lado de intensidad de fluorescencia fuerte en las células HEK-293T

que expresan GARP (que se denominan "HEK-293T transfectadas con hGARP" en la figura) en comparación con el histograma para IgG humana de control.

5 **[0362]** A partir de los resultados antes mencionados, se averiguó que h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se unían específicamente a GARP.

8)-2 Unión a GARP-TGF β 1

8)-2-1 Construcción del vector de expresión del mutante de GARP humano

10 **[0363]** Usando un vector de expresión de GARP humana (Origene) como plantilla, y también usando el cebador F (cacggcaacgtgctggagcggtgctgggggggagg) (SEQ ID NO: 44), el cebador R (caggctgttccagacaggtccag) (SEQ ID NO: 45), y KOD-Plus-Mutagenesis Kit (Toyobo), YSG en las posiciones de aminoácidos 137-139 en la secuencia de aminoácidos de GARP humana (SEQ ID NO: 1) se convirtió en HGN, con el fin de construir un vector de expresión mutante de GARP humana. Después, se confirmó la secuencia de nucleótidos de este vector.

8)-2-2 Coexpresión de GARP-TGF β 1

15 **[0364]** Usando Lipofectamine 2000 (Invitrogen), se transfectaron células HEK-293T con un vector de expresión de TGF β 1 humano (Sino Biological), así como con un vector de expresión de GARP humana o un vector de expresión mutante de GARP humana.

20 **[0365]** Las células se cultivaron en un medio DMEM (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS durante toda la noche en un 5 % de CO₂ a 37 °C, y luego las células se cosecharon de la placa tratándolas con TrypLE Express (Invitrogen). Las células cosechadas se lavaron dos veces con tampón FACS y se volvieron a suspender en la misma solución.

25 **[0366]** Los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 de la presente invención, anticuerpos conocidos (anticuerpos anti-GARP de IgG1 humana MHG8 y LHG10 que se produjeron en función de la información de secuencia descrita en la Bibliografía de Patente 1), e IgG humana de control (Eureka Therapeutics) se añadieron a la suspensión celular, y las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos.

30 **[0367]** Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se añadieron y suspendieron los anticuerpos anti-IgG marcados con PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y Horizon FVS450 (Becton Dickinson). Las células se incubaron además a 4 °C durante 15 minutos. El análisis de la citometría de flujo se llevó cabo como se describe en el Ejemplo 2, y se generaron histogramas de la intensidad de fluorescencia PE (Figura 38).

35 **[0368]** Se confirmó que los histogramas para todos los anticuerpos se desplazaron hacia el lado de intensidad de fluorescencia fuerte en las células HEK-293T cotransfectadas con TGF β 1 y GARP en comparación con los histogramas para la IgG de control (Figura 38).

40 **[0369]** Por otra lado, los histogramas para MHG8 y LHG10 no se desplazaron y fueron similares a los histogramas para la IgG de control en las células HEK-293T cotransfectadas con TGF β 1 y un mutante de GARP, mientras que los histogramas para los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se desplazaron hacia el lado de intensidad de fluorescencia fuerte en las células. Por consiguiente, se demostró que los anticuerpos MHG8 y LHG10 no se unieron al mutante de GARP, como se describe en [Bibliografía no de patente 12].

45 **[0370]** A partir de los resultados mencionados anteriormente, se demostró que los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se unían tanto a GARP como al mutante de GARP en las células que coexpresan TGF β 1, y se descubrió que estos anticuerpos se unían a regiones diferentes de aquellas a las que se unían los anticuerpos MHG8 y LHG10.

Ejemplo 9: Unión a células endógenas que expresan GARP

9)-1 Análisis de la citometría de flujo usando células L428

50 **[0371]** Las células L428 se lavaron dos veces con tampón FACS y se suspendieron en la misma solución. Después, se añadieron h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4 e IgG humana de control (IgG humana: Eureka Therapeutics) a la suspensión, y las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos. Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se añadió y suspendió el anticuerpo anti-IgG marcado con PE (Jackson ImmunoResearch Laboratories). Las células se incubaron a 4 °C durante 15 minutos. El análisis de la citometría

de flujo se llevó cabo como se describe en el Ejemplo 3, y se generaron histogramas de la intensidad de fluorescencia PE.

- 5 **[0372]** Como resultado, los histogramas para los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se desplazaron hacia el lado de intensidad de fluorescencia fuerte en las células L428 en comparación con los histogramas para la IgG de control. Por consiguiente, se confirmó que h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se unían a GARP expresada endógenamente (Figura 39).

9)-2 Análisis de la citometría de flujo usando Treg humana

- 10 **[0373]** La PBMC humana congelada (Cellular Technology) se descongeló de acuerdo con los protocolos, y la PBMC se sembró a 2×10^6 células/mL en una placa de 24 pocillos (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) usando un medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS.

- 15 **[0374]** Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 (Life technologies) se añadió a la placa, y las células se cultivaron durante 48 horas. A continuación, las células se suspendieron en tampón FACS y se añadieron los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4, así como IgG humana de control (IgG humana: Eureka Therapeutics). También se añadió a la suspensión el anticuerpo anti-CD4 marcado con APC (Becton Dickinson). Las células se incubaron a 4 °C durante 10 minutos.

- 20 **[0375]** Las células se lavaron dos veces con tampón FACS y, después, se añadieron y suspendieron los anticuerpos anti-IgG marcados con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories) y Horizon FVS450 (Becton Dickinson). Las células se incubaron además a 4 °C durante 15 minutos.

- 25 **[0376]** Las células se lavaron con tampón FACS y se volvieron a suspender en una solución usando el conjunto de tampones de tinción FoxP3 (Miltenyi Biotec). Después de eso, el anticuerpo anti-Foxp3 marcado con PE (Miltenyi Biotec) se añadió a las células y las células se incubaron además a 4 °C durante 30 minutos.

- 30 **[0377]** Después de que se lavaran las células, las células se midieron usando un citómetro de flujo (FACS Canto II; Becton Dickinson). Las células CD4 positivas se analizaron usando FlowJo (Tree Star) después de eliminar las células muertas del análisis separando las células teñidas con Horizon FVS450.

- [0378]** Los resultados demostraron que los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 se unieron a Treg positivas en FoxP3 (Figura 40).

Ejemplo 10: Propiedades del anticuerpo anti-GARP

10)-1 Actividad de ADCC

- 35 **[0379]** Los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4, los anticuerpos conocidos (anticuerpos anti-GARP de IgG1 humana MHG8 y LHG10 que se produjeron en función de la información de secuencia descrita en la Bibliografía de Patente 1), e IgG humana de control (Sigma) se analizaron para su actividad de ADCC de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4.

- 40 **[0380]** Los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron actividad citolítica en las células L428 de una manera dependiente de la concentración del anticuerpo (Figura 41A).

- 45 **[0381]** En contraste, como se describe en el Ejemplo 4, MHG8 y LHG10 no exhibieron dicha actividad citolítica de la misma manera que tampoco lo hizo la IgG humana de control (Figura 41B).

- [0382]** A partir de los resultados mencionados anteriormente, se demostró que los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 tenían actividad de ADCC.

10)-2 Actividad inhibidora a la función de Treg

- 50 **[0383]** Los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4, y h198D-H3L4 se analizaron por su actividad inhibidora de la función Treg de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4. La actividad inhibitoria de h151D-H1L1, h151D-H4L4, y h198D-H3L4 a la función Treg a una concentración final de 1 µg/mL se muestra en la Figura 42 (tasa inhibidora de h151D-H1L1: 81,5 % ; tasa inhibidora de h151D-H4L4: 80,4 % ; y tasa inhibidora de h198D-H3L4: 70,8 %).

[0384] Se demostró que los anticuerpos h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 tenían actividad inhibidora a la función de Treg.

10)-3 Actividad antitumoral (*in vitro*)

5 10)-3-1 Preparación de linfocitos T citotóxicos (CTL)

[0385] De acuerdo con el protocolo de la Universidad de Mie, las células CTL que tienen un receptor de células T específico de NY-ESO-1 (MU28 CD8B35 Clon núm. 7: obtenido de la Universidad de Mie) se incubaron a 3×10^5 células en un matraz de 25 cm² (Sumitomo Bakelite Co, Ltd.) en presencia de un anticuerpo anti-CD3 (OKT3: Imgenex), IL-2 (Novartis) y células alimentadoras en un medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de suero AB masculino humano (Sigma) durante 7 días.

[0386] Con respecto a las células alimentadoras, se descongeló la PBMC humana congelada (Cellular Technology) y se eliminaron las células positivas en CD8 de la PBMC usando microperlas CD8 (Miltenyi Biotech) para obtener PBMC reducida en CD8 ($7,5 \times 10^6$ células/25 cm² matraz) y se irradiaron las células con rayos X. Además, las células 103-LCL (obtenidas del Riken BioResource Center) ($1,5 \times 10^6$ células/25 cm² matraz) también se irradiaron con rayos X usando un irradiador de rayos X (Hitachi Medical Corporation). Estas células se usaron como células alimentadoras.

[0387] Las Treg obtenidas por el método descrito en el Ejemplo 4)-2-1 se añadieron al iniciar el cultivo ($1,5 \times 10^5$ células/25 cm² matraz) para evaluar el efecto supresor de las Treg sobre la actividad de las células CTL. Además, se añadieron las Treg ($7,5 \times 10^4$ células/25 cm² matraz) obtenidas por el método mencionado anteriormente y los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4, h198D-H3L4 e IgG1 humana (Enzo) al iniciar el cultivo (10 µg/ml) para evaluar la actividad antitumoral de cada anticuerpo.

[0388] Una vez finalizado el cultivo, se purificaron y separaron las células positivas en CD8 para preparar células CTL utilizando un kit de aislamiento de células T CD8+ (Miltenyi Biotech). Después, las células CTL preparadas se usaron en la evaluación de la actividad.

10)-3-2 Preparación de células objetivo

[0389] Una línea celular de melanoma humano, en concreto, células SK-MEL-52 que expresan NY-ESO-1 (obtenidas de la Universidad de Mie: Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 Jul; 77(7): 4260-4) se cultivaron usando un medio RPMI1640 (Invitrogen) suplementado con un 10 % de FBS. El etiquetado de las células con ⁵¹Cr se llevó a cabo como se describe en el Ejemplo 4)-1-2, y las células se ajustaron a 2×10^4 células/mL. Las células obtenidas se definieron como células objetivo.

10)-3-3 Ensayo de liberación de ⁵¹Cr

[0390] Las células objetivo se dispensaron en una microplaca de 96 pocillos con fondo en U (Costar) (50 µl/pocillo).

[0391] Posteriormente, las células CTL se añadieron células CTL a la placa (100 µl/pocillo), de manera que el número de células CTL fuera 16, 8, 4 o 2 veces superior al número de células objetivo (células CTL : células objetivo = 16 : 1, 8 : 1, 4 : 1 o 2 : 1), y las células se incubaron en un 5 % de CO₂ a 37 °C durante 4 horas. Después de eso, las células se procesaron de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4)-1-3. Cabe destacar que la actividad inhibidora de una muestra se calcula cada vez en cada experimento. Además, se confirmó que las células CTL no exhiben actividad citolítica frente a las células que no expresan NY-ESO-1.

[0392] Los resultados de las mediciones se muestran en la Figura 43 y 44.

[0393] La actividad citolítica de las células CTL frente a SK-MEL-52 fue suprimida por las Treg (Figura 43).

[0394] Por otro lado, las tasas de lisis celular de las células CTL contra las células SK-MEL-52 se elevó a medida que aumentaba el número de las células CTL en las células CTL a las que se habían añadido los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 o h198D-H3L4, y, también, las tasas de lisis celular fueron claramente superiores a las de las células CTL de control a las que se había añadido la IgG de control (Figura 44) en cualquier relación objetivo-efector.

[0395] Por lo tanto, se demostró que los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 inhibían la actividad supresora de las células Treg a CTL, y aumentaban la actividad antitumoral.

10)-4 Actividad antitumoral (*in vivo*)

[0396] Se sabe que los efectos antitumorales de un anticuerpo quimérico con actividad ADCC pueden evaluarse en ratones NOD/Shi-scid, IL-2R nulos (NOG) en los que se han trasplantado las células L428 y se administran PBMC humanas (J Immunol. Octubre de 2009, 1; 183(7): 4782-91).

[0397] Las células L428 (DSMZ), que se habían suspendido en una solución mixta de un medio RPMI1640 (Invitrogen) y Matrigel (Becton Dickinson) (1 : 1) a 1×10^7 células/mL, se trasplantaron en un volumen de 0,1 mL en el subcutis de la región axilar de ratones NOG (hembra, ciencia *in vivo*). El día en el que se trasplantaron las células L428 se definió como Día 0. En el día 6, los ratones se dividieron en grupos en función del valor del volumen del tumor (n = 6 en cada grupo), y los grupos de administración se establecieron como sigue.

[0398]

Control de PBS 1: administrado los días 6, 10, 14, 18, 22 y 26, y también, PBMC humana (Lote: 20140707) se administró los días 6, 14 y 22

Anticuerpo 105F: administrado a una dosis de 5mg/kg los días 6, 10, 14, 18, 22 y 26, y también, PBMC humana (Lote: 20140707) se administró los días 6, 14 y 22

Control de PBS 2: administrado los días 6, 10, 14, 18 y 22, y también, PBMC humana (Lote: 20150924) se administró los días 6, 14 y 22

Anticuerpo h151D-H1L1: administrado a una dosis de 1mg/kg los días 6, 10, 14, 18, y 22, y también, PBMC humana (Lote: 20150924) se administró los días 6, 14 y 22

Anticuerpo h151D-H4L4: administrado a una dosis de 1mg/kg los días 0, 6, 10, 14, 18, y 22, y también, PBMC humana (Lote: 20150924) se administró los días 6, 14 y 22

Anticuerpo h198D-H3L4: administrado a una dosis de 1mg/kg los días 0, 6, 10, 14, 18, y 22, y también, PBMC humana (Lote: 20150924) se administró los días 6, 14 y 22

[0399] Cada anticuerpo se diluyó con PBS (Invitrogen) y se administró a los ratones a través de la vena de la cola (10 mL/kg).

[0400] En cuanto a las PBMC humanas, las PBMC humanas congeladas (Cellular Technology) se descongelaron de acuerdo con los protocolos y se prepararon a 1×10^7 células/mL. Las células preparadas (0,2 mL) se administraron a los ratones a través de la vena de la cola.

[0401] Se midieron el diámetro largo (mm) y el diámetro corto (mm) del tumor a lo largo del tiempo, usando calibradores digitales electrónicos (Mitutoyo), y a continuación se calculó el volumen del tumor de acuerdo con la siguiente expresión.

$$\text{Volumen del tumor (mm}^3\text{)} = 1/2 [\text{diámetro largo del tumor}] \\ \times [\text{diámetro corto del tumor}] \times [\text{diámetro corto del tumor}]$$

[0402] En la Figura 45 se muestra un cambio en el valor medio \pm error estándar (SE, por sus siglas en inglés) del volumen del tumor en cada grupo.

[0403] Los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron actividad antitumoral frente a las células L428, en comparación con el grupo de control al que sólo se administró PBMC. Por consiguiente, se observó una diferencia significativa con respecto al grupo de control (105F: prueba t; y h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4: prueba de comparación múltiple de Dunnett). Los resultados de la prueba de diferencia significativa (valores P) en el último día de medición de los grupos individuales (105F: día 31; y h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4: día 25) también se muestran en la figura.

[0404] Por consiguiente, los anticuerpos 105F, h151D-H1L1, h151D-H4L4 y h198D-H3L4 exhibieron actividad antitumoral en modelos *in vivo*.

Ejemplo 11: Análisis de epítomos del anticuerpo anti-GARP

[0405] Los epítomos de los anticuerpos GARP antihumanos (105F, 110F, h151D-H1L1 y h198D-H3L4) se analizaron mediante espectrometría de masas de intercambio de hidrógeno-deuterio.

[0406] Se mezcló un anticuerpo GARP antihumano de 7 mg/mL con GARP humana de 3 mg/mL (R&D Systems) o un tampón blanco en cantidades iguales. A la solución obtenida se añadieron 9 equivalentes de agua ligera o agua pesada. Después de 30 segundos, 480 segundos o 6000 segundos de la adición del agua, o después de haber transcurrido una noche, se añadieron a la muestra, en cantidades iguales, ácido fosfórico 100 mM, Gdn-HCl

4 M y TCEP 150 mM (pH 2,5), de manera que la mezcla obtenida se sometiese después a la sustitución por deuterio. La muestra sustituida de esta manera por deuterio se inyectó en HPLC bajo refrigeración, y luego se suministró a una columna de pepsina inmovilizada con una solución de 0,1 % de TFA.

5 **[0407]** Un fragmento peptídico obtenido mediante digestión de GARP humana en la columna de pepsina se retuvo en una columna trampa C18, se eluyó a continuación mediante un gradiente lineal de agua y acetonitrilo al que se había añadido 0,1 % de ácido fórmico y 0,025 % de TFA, y se separó después en una columna de análisis C18. El fragmento peptídico separado se sometió a espectrometría de masas usando un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo.

10

[0408] La tasa de sustitución por deuterio se calculó a partir de la masa de cada péptido. Un fragmento peptídico, en el que se observó una reducción significativa de la tasa de sustitución por deuterio como resultado de la adición del anticuerpo GARP antihumano, fue identificado como un fragmento epítipo.

15 **[0409]** En el caso de 105F, la supresión de la tasa de sustitución de deuterio se encontró en los residuos de aminoácidos en las posiciones 366-377, 407-445, y 456-470 de la GARP humana que se muestra en SEQ ID NO: 1, y por consiguiente, fueron identificados como un epítipo.

20 **[0410]** En el caso de 110F, la supresión de la tasa de sustitución de deuterio se encontró en los residuos de aminoácidos en las posiciones 54-112 y 366-392 de la GARP humana que se muestra en SEQ ID NO: 1, y por consiguiente, fueron identificados como un epítipo.

25 **[0411]** En el caso de h151D-H1L1, la supresión de la tasa de sustitución de deuterio se encontró en los residuos de aminoácidos en las posiciones 352-392 de la GARP humana que se muestra en SEQ ID NO: 1, y por consiguiente, fueron identificados como un epítipo.

[0412] En el caso de h198D-H3L4, la supresión de la tasa de sustitución de deuterio se encontró en los residuos de aminoácidos en las posiciones 18-112 de la GARP humana que se muestra en SEQ ID NO: 1, y por consiguiente, fueron identificados como un epítipo.

30 Aplicabilidad industrial

[0413] El anticuerpo anti-GARP de la presente invención tiene una actividad antitumoral causada por la actividad inhibidora de la función Treg, que está mediada por una actividad de ADCC, y por consiguiente, una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo anti-GARP se puede usar como agente anticanceroso.

35 **[0414]** Además, la presencia excesiva de las Treg y la activación de las mismas en pacientes que tienen malaria e infección por el VIH exhibe una correlación con el estado de la enfermedad y la eliminación de las Treg induce la remisión de cada enfermedad en modelos murinos para las enfermedades. En consecuencia, se puede esperar que la inhibición efectiva de la función de las Treg tenga también efectos terapéuticos en infecciones refractarias, tales como la malaria y el VIH.

40 Lista de secuencias de texto libre

[0415]

SEQ ID NO: 1 - Secuencia de aminoácidos de GARP

SEQ ID NO: 2 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 105F

SEQ ID NO: 3 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 105F

45 SEQ ID NO: 4 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 110F

SEQ ID NO: 5 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 110F

SEQ ID NO: 6 - Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo 105F

SEQ ID NO: 7 - Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo 105F

SEQ ID NO: 8 - Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo 110F

50 SEQ ID NO: 9 - Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo 110F

SEQ ID NO: 10 - Cebador A

SEQ ID NO: 11 - Cebador B

SEQ ID NO: 12 - Cebador C

SEQ ID NO: 13 - Cebador D

55 SEQ ID NO: 14 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada 151D

SEQ ID NO: 15 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada 151D

SEQ ID NO: 16 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera 151D

SEQ ID NO: 17 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera 151D

SEQ ID NO: 18 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la región variable de la cadena pesada 198D

	SEQ ID NO: 19 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada 198D
	SEQ ID NO: 20 - Secuencia de nucleótidos de ADNc que codifica la región variable de la cadena ligera 198D
	SEQ ID NO: 21 - Secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera 198D
5	SEQ ID NO: 22 - Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN que comprende la secuencia de señal de la cadena ligera humana y la secuencia que codifica los aminoácidos en la región constante de la cadena k humana
	SEQ ID NO: 23 - Secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN que comprende la secuencia de señal de la cadena pesada humana y la secuencia que codifica los aminoácidos en la región constante de IgG1 humana
10	SEQ ID NO: 24 - Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano c151D
	SEQ ID NO: 25 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano c151D
	SEQ ID NO: 26 - Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humano c151D
	SEQ ID NO: 27 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humano c151D
	SEQ ID NO: 28 - Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano c198D
15	SEQ ID NO: 29 - Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo quimérico humano c198D
	SEQ ID NO: 30 - Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humano c198D
	SEQ ID NO: 31 - Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo quimérico humano c198D
	SEQ ID NO: 32 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h151D-H1
	SEQ ID NO: 33 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h151D-H1
20	SEQ ID NO: 34 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h151D-H4
	SEQ ID NO: 35 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h151D-H4
	SEQ ID NO: 36 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h151D-L1
	SEQ ID NO: 37 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h151D-L1
	SEQ ID NO: 38 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h151D-L4
25	SEQ ID NO: 39 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h151D-L4
	SEQ ID NO: 40 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h198D-H3
	SEQ ID NO: 41 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h198D-H3
	SEQ ID NO: 42 - Secuencia de nucleótidos del anticuerpo humanizado h198D-L4
	SEQ ID NO: 43 - Secuencia de aminoácidos del anticuerpo humanizado h198D-L4
30	SEQ ID NO: 44 - Cebador F
	SEQ ID NO: 45 - Cebador R

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene las siguientes propiedades:

- (1) que se une específicamente a la glicoproteína A predominante en repeticiones (GARP)
 (2) que tiene una actividad inhibidora de la función inmunosupresora de las células T reguladoras;
 (3) que tiene actividad citotóxica celular dependiente de anticuerpos (ADCC); y
 (4) que tiene actividad antitumoral *in vivo*,

que tiene:

- (a) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37;
 (b) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 39; o
 (c) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

2. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 37.

3. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 136 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 39.

4. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo tiene una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 139 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 129 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

5. El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 4, donde el tumor es un cáncer.

6. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 5, donde el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer en la sangre.

7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 6, que tiene:

- (1) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 37,
 (2) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 39, o
 (3) una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 469 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

8. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene:

- una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 33, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 37.

9. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene: una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 466 que se muestra en SEQ ID NO: 35, y una cadena

ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 39.

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 7, que tiene:
5 una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 20 a la 469 que se muestra en SEQ ID NO: 41, y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos de la 21 a la 234 que se muestra en SEQ ID NO: 43.

11. Un polinucleótido que codifica el anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10.
10

12. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 11, que tiene:

- (1) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 que se muestra en SEQ ID NO: 32, y un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 36,
15 (2) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 408 que se muestra en SEQ ID NO: 34, y un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 38, o
20 (3) un polinucleótido de una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 417 que se muestra en SEQ ID NO: 40, y un polinucleótido de una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 387 que se muestra en SEQ ID NO: 42.

13. El polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 12, que tiene:
25

- (1) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 que se muestra en SEQ ID NO: 32, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 36,
30 (2) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1398 que se muestra en SEQ ID NO: 34, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 38, o
35 (3) un polinucleótido de una cadena pesada que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 58 a la 1407 que se muestra en SEQ ID NO: 40, y un polinucleótido de una cadena ligera que consiste en la secuencia de nucleótidos en las posiciones de nucleótidos de la 61 a la 702 que se muestra en SEQ ID NO: 42.

14. Un vector de expresión que comprende el polinucleótido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 11 a la 13.
40

15. Células huésped transformadas con el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 14.

16. Un método de producción de un anticuerpo de interés o un fragmento del mismo, que comprende una etapa de cultivo de las células huésped de acuerdo con la reivindicación 15, y una etapa de recogida de un anticuerpo de interés del cultivo obtenido por la etapa mencionada anteriormente.
45

17. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10, que comprende una o dos o más modificaciones seleccionadas del grupo que consiste en glicosilación N-ligada, glicosilación O-ligada, procesamiento N-terminal, procesamiento C-terminal, desamidación, isomerización de ácido aspártico, oxidación de metionina, adición de un residuo de metionina al N-terminal, amidación de un residuo de prolina y una cadena pesada que comprende una delección de uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo.
50

18. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 17, donde se delecionan uno o dos aminoácidos en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo.
55

19. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 18, donde un aminoácido se deleciona en cada uno de los extremos carboxilos de ambas de las cadenas pesadas del mismo.
60

20. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 17 a la 19, donde un residuo de prolina en el extremo carboxilo de una cadena pesada del mismo está además amidado.

21. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones de la 1 a la 10 y de la 17 a la 20, donde la modificación de la cadena glucídica está regulada para mejorar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

5 22. Una composición farmacéutica que comprende al menos uno de los anticuerpos de acuerdo con las reivindicaciones de la 1 a la 10 y de la 17 a la 21.

23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22, que es para su uso en terapia tumoral.

10 24. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 23, donde el tumor es un cáncer.

25. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 24, donde el cáncer es un cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer urotelial, cáncer de colon, cáncer de próstata, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario, cáncer de páncreas, cáncer de mama, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de esófago o cáncer en la sangre.

[Figura 1]

Secuencia de aminoácidos de glicoproteína A predominante en repeticiones (GARP) SEQ ID NO: 1

MRPQILLLLALLTLGLAAQHQDKVPCKMVDKKVSCQVLGLLQVPSVLFPDTEITLDLSCNQLR
SILASPLGFYTALPHLDLSTNEISFLQPGAFQALHLEHLSLAHNRLAMATASAGGLQPLP
RVTSLDLSCNSLYSGLLERLLGEAPSLHTLSLAENSLTNLTRHTFRDMPALEQLDLHSNVLN
DIEDGAFEGCLPRLTHLNLSRNSLTCSIDFSLQQLRVLDLSCNSIEAFQTASQPQAEFQLTWL
DLRENKLLHFPDLAALPRLIYLNLSNNLIRLPTGPPQDSKGIHAPSECWSALPLSAPSGNAS
GRFLSQLLNLDLSYNEIELIPDSFLEHLTSLCFLNLSRNCLRTFEAPRLGSLPCLMLLDLSH
NALETLELGARALGSLRTLILQGNALRDLPPYTFANLASLQRLNLQGNVSPCGGFDEPGPS
GCVAFSGITSLSLSLVDNEIELLRAGAFLEHTPLTELDLSSNPGLEVATGALGGLEASLEVL
ALQGNELMVLQVDLPCFICLKRNLNLAENELSHLPANTQAVSLEVLDLRNNSFSLLEGSAMSG
LETSLRPLYLQGNFLSCCGNGWLAACLHQGRVVDVATQDLICRFSSQEEVSLSHVRPEDCEK
GGLKNINLIIILTFILVSAIILLTTLAACCCVRRQKFNQYKA

[Figura 2]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo 105F (SEQ ID NO: 2)

EVQLLESQGGSLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSDYYMSWIRQAPGKGLEWVSCVSWNGSRKTHYAD
SVKGRFTISPDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQFQLAEFDYWGQGTILVTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPFCPAPELLGGPSVFLFPPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVRNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKARGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG
FYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVNHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

[Figura 3]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo 105F (SEQ ID NO: 3)

QSVLTQPPFSASGTFPGQRTVITISCTGSSSNIGAGYVWHWYQQLPGTAPKLLIYADTNRPSGVPD
RFSGSKSGTASASLAIISGLRSEDEADYYCQSYDSSLRGWVFGGGTELTVLGQPKAAPSVTLFPP
PSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNKNKYAASSYLST
PEQWKSNNRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[Figura 4]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo
110F (SEQ ID NO: 4)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPFGKGLEWVAGISWNSAITVYAD
SVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAGGRYSYGFYDYWGQGTLLTVSSA
STKGPSTVFLAPSSSEKSTSGCTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCTPCCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVRNARKTPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIERTISKANGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVN
HEALNNWYTKQSLSLSPGK

[Figura 5]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo
110F (SEQ ID NO: 5)

QSVLTQPPSASGTFQGVTTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPQTAPKLLIYGNSNRPSGVPD
RFGSGKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDRSLNWVFGGTELTVLQPKAAPSVTLFPP
SSERLQANKATLVCLISDFYEGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNMKYAASSTLSLTP
EQWKSRRSYSCQVTEGQSTVEKTVAPTECS

[Figura 6]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo
105F (SEQ ID NO: 6)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTGACTACTACATGAGCTGGATCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTATCGGGTGTAGTTGGAATGGCAGTAGGACCCACTATGCAGAC
TCTGTGAAGGGCCGATTCAACATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCCAGACAGAGGCAGCTGGCTG
AATTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCCTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTCCACCAAGGGCCA
AGCGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTG
CCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCA
GCGGGCTGCACACCTTCCCCGCTGTCCTGCAGTCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTG
GTGACCGTGCCTTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCC
CAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAATCACAACATGCC
CACCTTGCCTAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTTCTTCCCCCCTAAAACCC
AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCA
CGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA
CAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCAGCTACCGGGTGGTCAGCGTCTTCACTCGTCTG
CACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGC
CCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCGCGGAACACAGGTGTACACCC
TGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC
TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACTACAA
GACCACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTTCTACAGCAAGCTCACCCTGG
ACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCGGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[Figura 7]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo
105F (SEQ ID NO: 7)

```

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
CTGCACTEGGAGCAGCTCCAACATTGGGGGGGGTTATGTTGTACATTGGTATCAGCAGCTCC
CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGCTGACACCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGGCATCAGTGGGCTCCGGTCCCA
GGATGAGGCTGATTATTACTGCCAGTCCCTATGACAGCAGCCTGAGAGGTTGGGTGTTCCGGC
GAGGAACCAAGCTGACGGTCCCTAGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCCTAGCGTGACCCCTGTTCCCT
CCTTCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTA
CCCTGGCGCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCTGTGAAGGCCGCACTGGAGA
CCACCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTACCTGAGCCTTACC
CCTGAGCAGTGGAAGTCTACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGT
GGAGAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTC

```

[Figura 8]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo
110F (SEQ ID NO: 8)

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC
CTGTGCAGCCTCTGCATTACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAG
GCAAGGGGCTGGAGTGGGTGCGCGGAATTAGTTGGAACAGTGCCATCACAGTCTATGCGGAC
TCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAAATCCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAAT
GAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTGTATTACTGTGCAAAAGATGCCCGGGGGCCGGT
ATAGTGGGAGCTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCCTGAGCTCAGCC
TCCACCAAGGGCCCAAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCAC
AGCCGCCCTGGGCTGCCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAAC
CAGGCGCCCTGACCAGCGGCTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTGCAGTCTCTCAGGACTCTAC
TCCCTCAGCAGCCTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAA
CGTGAATCACAAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AACTCACACATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAACCTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAAAACCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT
GGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG
TGCATATGCCAAGACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGC
GTCCTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCAA
CAAAGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAAC
CACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCCGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACC
TGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCC
CGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTTACA
GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCCTGATG
CATGAGGCTCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

[Figura 9]

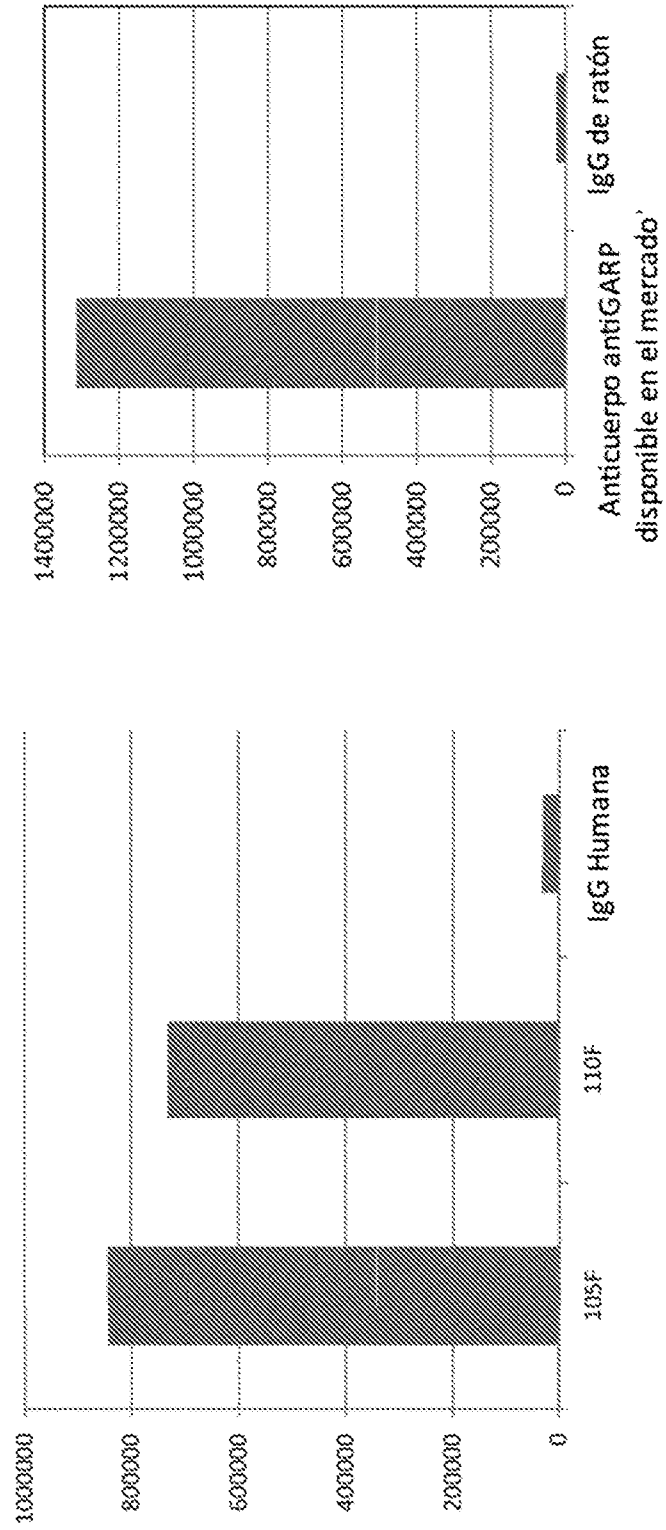
Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo
110F (SEQ ID NO: 9)

```

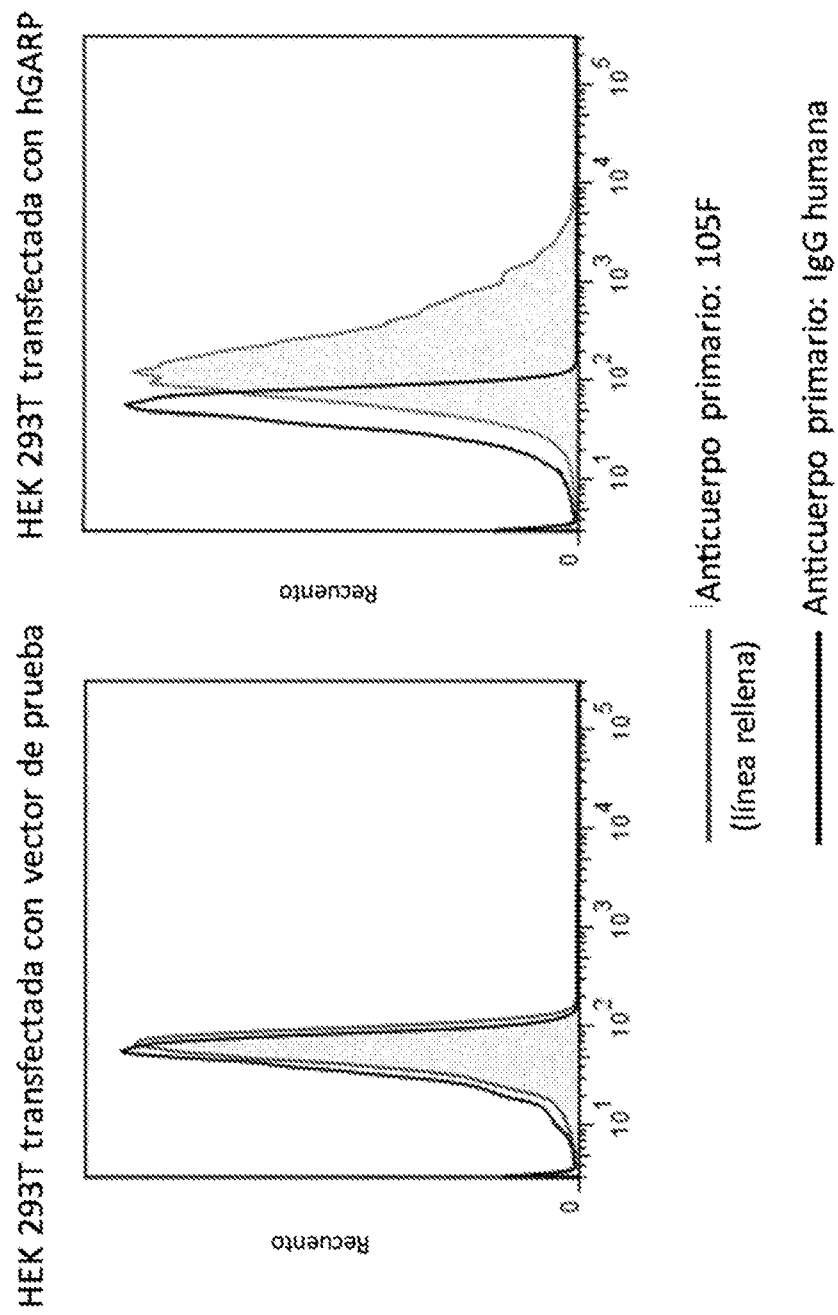
CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC
CTGCACFGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGCAGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCC
CAGGAACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTGAC
CGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATCASTGGGCTCCGGTCCGA
GGATGAGGCTGATTATTAAGTCCAGTCTTATGACAGAAGCCTGAATTGGGTGTTCCGGCGGAG
GAACCAAGCTGACGGTCCTAGGTGAGCCTAAGGCTGCCCCTAGCGTGACCCCTGTTCCCTCCT
TCCAGCGAGGAGCTTCAAGCTAACAAGGCCACCCTGGTGTGTCTTATCTCTGACTTCTACCC
TGGCCCTGTGACCGTGGCCTGGAAGGCTGACAGCTCCCCCTGTGAAGGCCGGAGTGAGACCA
CCACACCTAGCAAGCAGTCTAACAACAAGTACGCTGCCAGCTCCTAUCTGAGCCTTACCCCT
GAGCAGTGGAAAGTCTCACAGAAGCTACTCCTGTCAAGTGACCCACGAGGGCAGCACCGTGG
GAAGACCGTGGCTCCTACCGAGTGTTCC

```

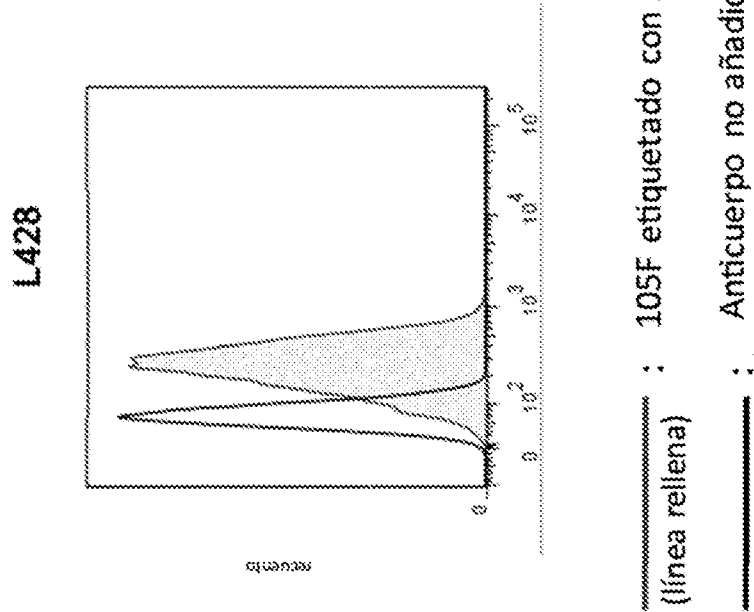
[Figura 10]



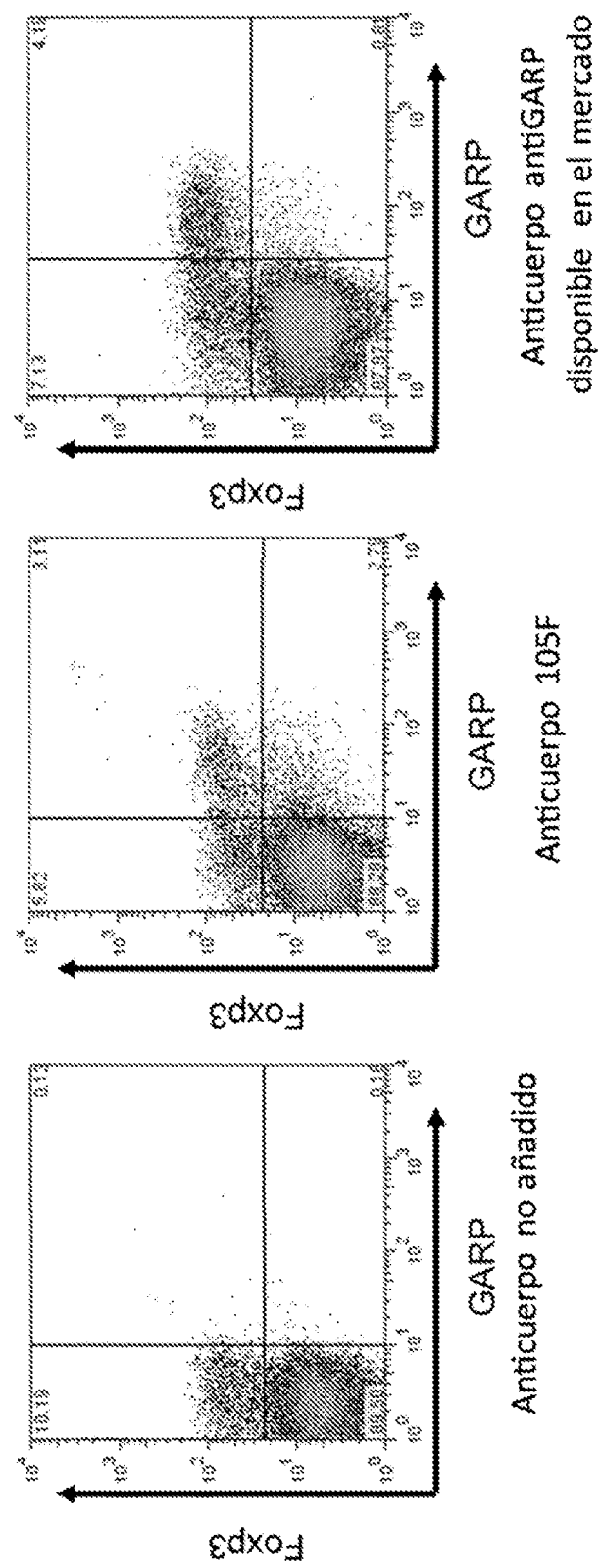
[Figura 11.]



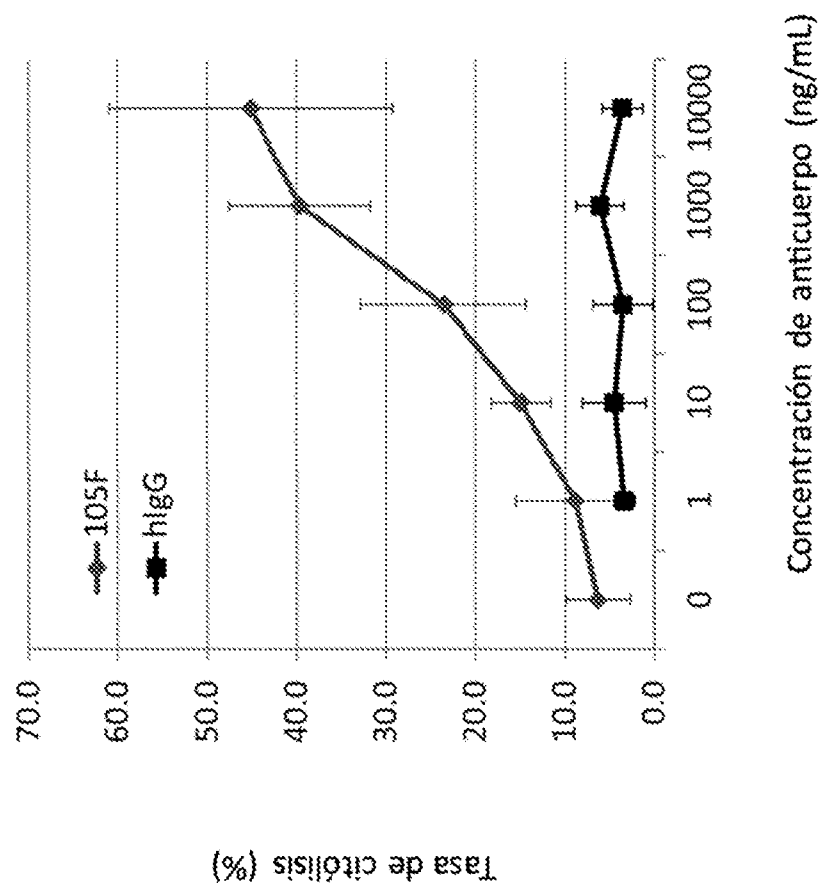
[Figura 12]



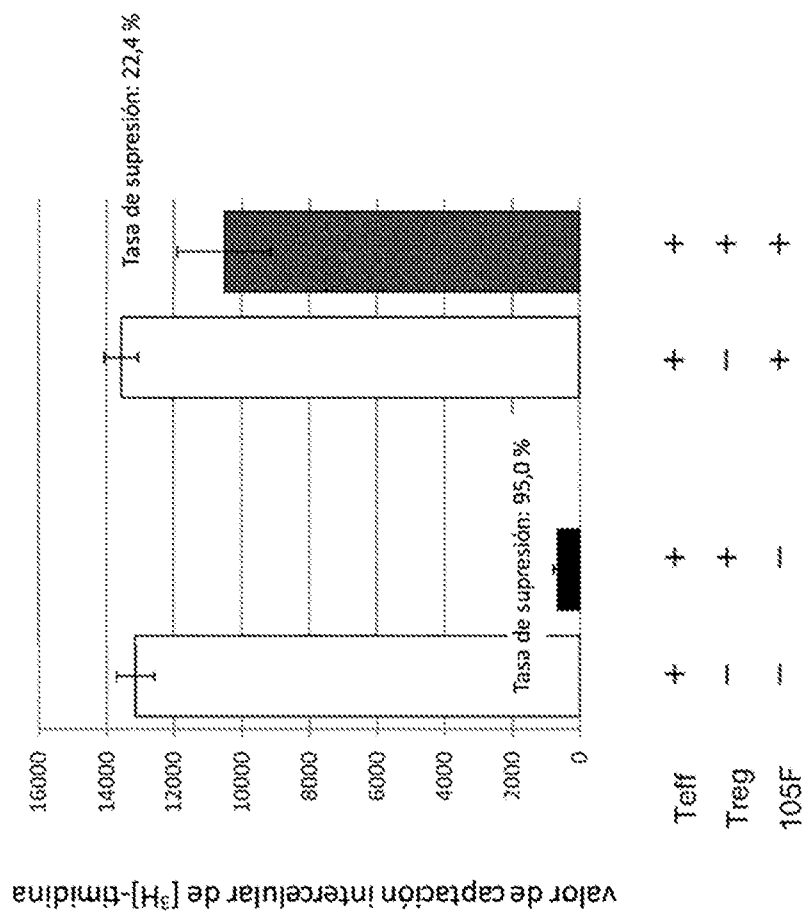
[Figura 13]



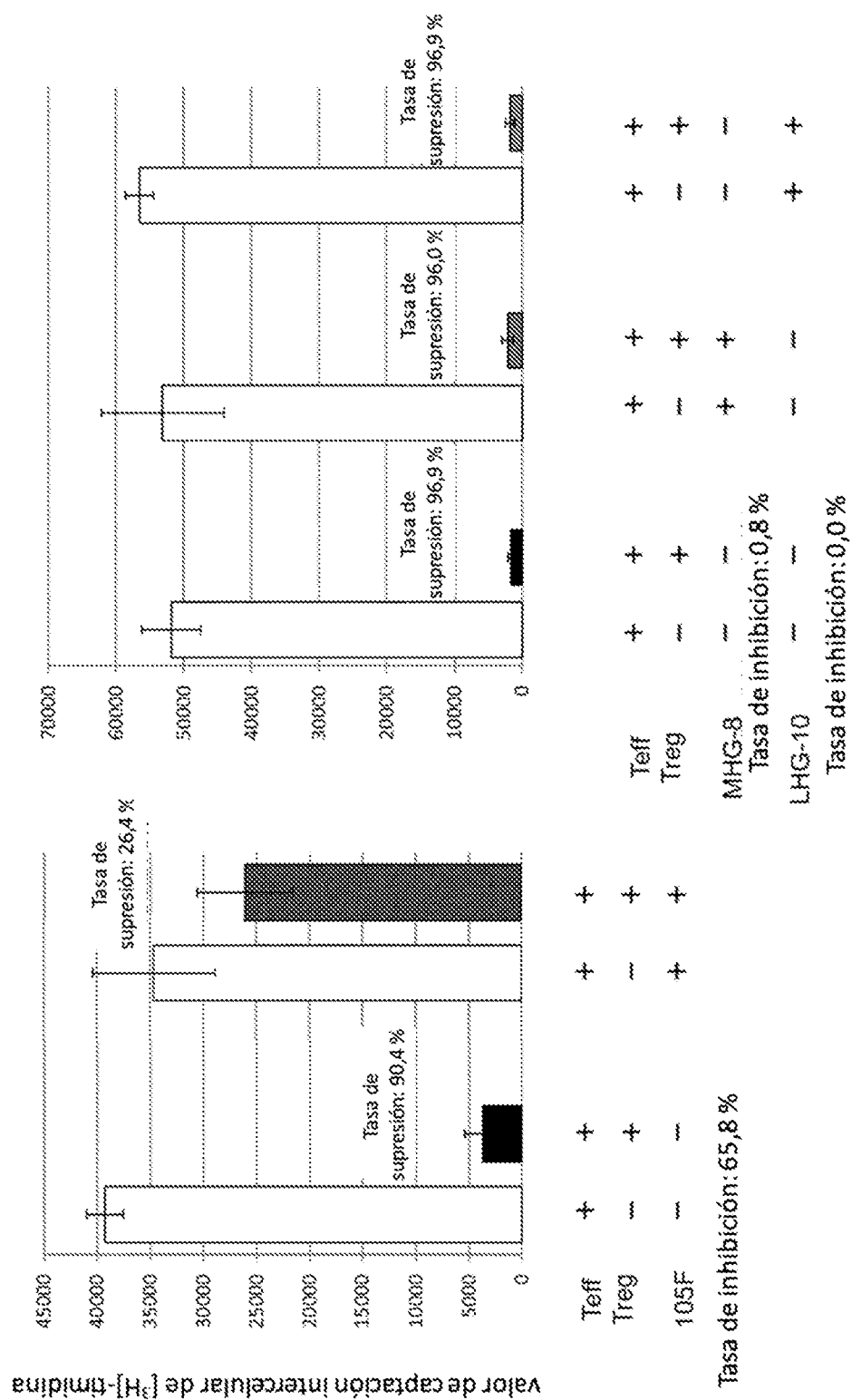
[Figura 14]



[Figura 15]



[Figura 16]



[Figura 17]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo
c151D (SEQ ID NO: 25)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGSRSEKLSKSSASGFTPSNYMAYVQAPTQ
GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDAKSTLYLQMDSLRSEDATYYCAREDYGGFF
HWGQGVMTVSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTCICNVNHRKPSNTRVDRKVEPKSCDKTHTCP
APELLGGPSVFLPPPKPDTLMISRTEFTVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYITTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ
GNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 18]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo
c151D (SEQ ID NO: 27)

SEQ ID NO: 27: secuencia de aminoácidos de la cadena ligera
del anticuerpo quimérico humano c151D

MVLQQTQVFISLLWLISGAYGNIVMTQSTSMFISVGLRVTMCKASQNVGTNVDWYQQKTEQ
SPKLLIYGASNRYTCVPRFTGSGSGTDFTLTISNMQAEDLAVYDCLQYKYNPYTPGTGTL
ELNRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKSTSYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 19]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada del anticuerpo
c198D (SEQ ID NO: 29)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSQVQLRPSGCPGLVQPSQTLSTCTVSGFSLTSPHVSWVRQPPK
GLEWLIATISSGGSTYYNSALKSKLSISRTSKSQVFLKMSTLQTEDTAMYPFCARISGWGHYY
VMDVWQQGASVTSSASTKGPSVFFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHRKPSNTRVDRKVEPKSCDKTHTC
PPCPAPELLGGPSVFLPPPKPDTLMISRTEFTVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGPREPQVYTL
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYITTPFVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSFVWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 20]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera del anticuerpo c198D (SEQ ID NO: 31)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPASLSGSLGETVTIQQASEDIYSGLAWYQQKFGK
 SPQLLIYGAGSLQDGVPSRFSGGSGSTHYSLKISSMQTEDEGVYFCQQGLKPLTFGSGTKL
 EIKRAVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 21]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada h151D-H1 (SEQ ID NO: 33)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTPSNYMAWVRQAPGK
 GLEWVSSIGTVGGNTYYADSVGEGRFTISRDDSENTLYLQMNSLRAEDTAVYYCABEDYGGFP
 HWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 22]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera h151D-L1 (SEQ ID NO: 37)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQNVGTNVDWYQQKPGQ
 SPKLLIYGASNEYTGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSSLQAEDVAVYDCLQYKYNPYTFGGSTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 23]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada h151D-H4 (SEQ ID NO: 35)

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTPSNYMAWVRQAPGK
 GLEWVASIGTVGGNTYYRDSVKGRFTISRDDSKSTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREDYGGFP
 HWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
 HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
 REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP
 SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 24]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera h151D-L4 (SEQ ID NO: 39)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGNIVMTQSPSSLSASVGDRTINCKASQNVGTNVDWYQQKPGK
 SPKLLIYGASNBRYTCVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYDCLQYKYNFYTFGGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 25]

Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada h198D-H3 (SEQ ID
 NO: 41)

MKHLWFFLLLVAAAPRWVLSEVQLVESGGGLVKPQSTLSLTCTVSGFSLTSEFHVSNVRQPPGK
 GLEWIAITISSGGGTYYNPSLKSPVTISRDTSKNQVSLKLSSVTAADTAVYYCARISGWGHYY
 VMDVWGQGTILVTVSSASTRGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTC
 PFCFAPPELLGGPSVFLFPPFKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDFEVKFNWYVDGEVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
 LPFSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRRWQCGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 26]

Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera h198D-L4 (SEQ ID
 NO: 43)

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASEDIYSGLAWYQQKPGK
 SPKLLIYGAGSLQDGVPSRFSGSGSGTHTYTLTISLQPEDFATYFCQQGLKFPPLTFGGQGTKV
 EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
 DSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 27]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo
cl51D (SEQ ID NO: 24)

```

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGCTGAGCGAGGT
GCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCAAGAACTCTCCTGTT
CAGCCTCAGGATTCACTTTTCAGTAACTATTACATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAACGCGAG
GGTCTGGAGTGGGTGCGATCCATTGGTACTGTTGGTGGTAACACTTACTATCGAGACTCCGT
GAAGGGCCGATTCACTATCTCCAGAGATGATGCAAAAAGCACCCCTATACCTGCAAAATGGACA
GTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCACTTATTACTGTGCAAGAGAGGATTACGGAGGGTTTCCC
CACTGGGGCCCAAGGAGTCATGGTCACAGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCCAAGCGTCTT
CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCCTGGTCA
AGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCCGCTGTCTCTGCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGT
GCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGCCCAAGCAACA
CCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACTCACACATGCCACCCCTGC
CCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCCCCAAGGACAC
CCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC
CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCC
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCACCAGGA
CTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCCATCG
AGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCA
TCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCC
CAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCAACC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGCAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGCAAA

```


[Figura 28]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo
c151D (SEQ ID NO: 26)

```

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGGATCTCCGGCGCGTACGGCAA
TATTGTGATGACTCAGTCTCCACATCCATGTTTCATATCAGTCGGAGACAGGGTCACCATGA
ACTGTAAGGCCAGTCAGAATGTGGGAACATAATGTAGACTGGTACCAGCAGAAAACAGGGCAG
TCTCCTAAACTGCTTATCTATGGGGCGTCCAACCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCAC
AGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAACATGCAGGCTGAAGACCTGG
CTGTTTATGACTGTCTACAGTATAAGTACAAATCCATACACGTTTGGAAGTGGGACCAAGCTG
GAACTGAACCGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCAGAGAGGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACCTCCAGAGAGCGTGACCGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCCTGGGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA
GCTTCAACAGGGGGGCACTGT

```

[Figura 29]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada del anticuerpo
c198D (SEQ ID NO: 28)

```

ATGAAACACCTGTGGTTCTTCCTCCTGCTGGTGGCAGCTCCCAGATGGGTGGCTGAGCCAGGT
GCAGCTGAGGGAGTCAGGACCTGGTCTGGTGCAGCCCTCACAGACCCCTGTCCCTCACCTGCA
CTGTCTCTGGGTTCTCACTAACCAGCTTTTCATGTAAGCTGGGTTCGCCAGCTCCAGAGAAG
GGTCTGGAGTGGATTGCAACAATTTCAAGTGGTGGAGGTACATATTATAATTGAGCTCTCAA
ATCCCGACTGAGCATCAGCAGGGACACCTCCAAGAGCCAAGTTTTCTTAAAGATGAGCACTC
TGCAAACTGAAGACACAGCCATGTACTTCTGTGCCCGGATTTCCGGGCTGGGGCCATTACTAT
GTTATGGATGTCTGGGGTCAAGGAGCTTCAGTCACCTGTCAGCTCAGCCTCCACCAAGGGUCC
AAGCGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCT
GCGTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCCGTGACCGTGAGCTGGAATCAGGCGCCCTGACC
AGGGGGCTGCACACCTTCCCCGCTGTCTTGCAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGT
GGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAAGC
CCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATGC
CCACCCCTGCCCCAGCACCTGAACCTCTGGGGGGACCCCTCAGTCTTCTCTTCCCCCCCCAAAACC
CAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC
ACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAG
ACAAAGCCCCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGGGTGGTCAGCGTCTCTACCCGTCTT
GCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAG
CCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGCCAGCCCCGGGAACACAGGTGTACACC
CTGCCCCCATCCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCCTGGTCAAAGG
CTTCTATCCCAGGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGCCAGCCCCGAGAACAACTACA
AGACACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGAGCCTCTCCTGTCTCCCGGCAAA

```

[Figura 30]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera del anticuerpo
c198D (SEQ ID NO: 30)

```

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCGTACGGCGA
CATCCAGATGACACAGTCTCCAGCTTCCCTGTCTGGATCTCTGGGAGAACTGTCACCATCC
AATGTCAAGCAAGTGAGGACATTTACAGTGCTTTAGCGTGCTATCAGCAGAAGCCAGGGAAA
TCTCCTCAGCTCCTGATCTATGGTGCAGGTAGCTTACAAGACGGCGTCCCATCACGATTCAG
TGGCGGTGGATCTGGCACACATTATTTCTCTCAAGATCAGCAGCATGCAAACTGAAGATGAAG
GGGTTTATTTCTGTCAACAGGGTTTAAAGTTTCCGCTCACGTTCCGTTCTGGGACCAAGCTG
GAGATCAAACGGGCTGTGGCCGCCCCCTCCGTGTTTCATCTTCCCCCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCCGGCACCGCCCTCCGTGGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTACCCCAGAGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGGAACTCCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAG
GACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAAGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCTCCCCCGTCACCAAGA
GCTTCAACAGGGGGGAGTGT

```

[Figura 31]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada h151D-H1 (SEQ ID NO: 32)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAACT
GCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTG
CCGCCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTACTACATGGCTGGGTGGACAGGCCCTGGCAAG
GGACTGGAATGGGTGTCTCTATCGGCCACCGTGGGCGGCAACACCTACTACGCCGATTCTGT
GAAGGGCCGTTTACCATCTCCCGGGACGACTCCAAGAACACCCCTGTACCTGCAGATGAACT
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGGCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCCT
CATTGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCTCCGTGTT
TCCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCCACCTCTGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTCGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCTCCGGCGTG
CACACCTTTCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCGTGTACTCCCTGTCTCCGTGCTGACTGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA
CCAAGGTGGACAAGCGGGTGGAAACCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCCCCTTGT
CCTGCCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCAAAGCCTAAGGACAC
CCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGGGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACC
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
AGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGTCATCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC
CTCGATATCGCCGTGGAAATGGGAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACCTACAAGACCACCC
CCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGSCAAA

[Figura 32]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera h151D-L1 (SEQ ID NO: 36)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCAICTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCSGCGCCTACGGCAA
CATCGTGATGACCCAGTCCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGAGCCACCATCA
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCAACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAG
TCCCTTAAGCTGCTGATCTACGGCGGCCAGCAACCGGTACACCGGCGTGCCCGATAGATTCTC
CGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACAATCAGCTCTCTGCAGGCCGAGGACGTGG
CCGTGTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCCGGCCAGGGCACAAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCCGTGCTGTGCTGCTGAACAACTTCTACCCCTCGCAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTECAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCTCCACCTGACCTCTTCCAAGGCGGACTACGA
GAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

[Figura 33]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada h151D-H4 (SEQ ID NO: 34)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT
GCAGCTGGTGAATCCGGCGGAGGCTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTGTCTTGTG
CCGCTCCGGCTTCACCTTCTCCAACCTACTACATGGCCTGGGTGCGACAGGCCCTGGCAAG
GGACTGGAATGGGTGGCCTCTATCGGCACCGTGGCGGCAACACCTACTACCGGATTCGT
GAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGACGACTCCAAGTCCACCTGTACCTGCAGATGAAC
CCCTGCGGGCCGAGGACACCGCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGGACTACGGCGGCTTCCT
CATGGGGCCAGGGCACACTCGTGACCGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCCTCCGTGT
TCTCTGGCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGCTGCCTCGTGA
AGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACAGTGTCTTGGAACTCTGGCGCCCTGACCAGCGCGTG
CACACCTTTCAGCTGTGCTGCAGTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCTCCGTCTGTGACTGT
GCCCTCCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCTCCAACA
CCAAGGTGGACAAGCGGTGGAAACCAAGTCTTGGCACAAGACCCACACCTGTCCCCCTGT
CCTGCCCTGAACTGCTGGGCGGACCTTCCGTGTCTCTGTTCCCCCAAAGCCCAAGGACAC
CCTGATGATCTCCCGGACCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCACGAGGACC
CTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCT
AGAGAGGAACAGTACAACCTCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCATCAGGA
CTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCG
AAAAGACCATCTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGGGAACCCAGGTGTACACACTGCCCCCT
AGCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGTCTCGTGAAAGGCTTCTACCC
CTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACCTACAAGACCACCC
CCCTGTCTGGACTCCGACGGCTCATTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTGGACAAGTCC
CGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA
CACCCAGAAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAAA

[Figura 34]

Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera h151D-L4 (SEQ ID NO: 38)

ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCGCCTACGGCAA
CATCGTGATGACCCAGTCCCCCTCCAGCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA
ACTGCAAGGCCTCCCAGAACGTGGGCACCAACGTGGACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCAAG
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCCAGCAACAGATACACCGGCGTGCCCGACAGATTCTC
CGGCTCTGGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCTGCAGCCCGAGGACTTCG
CCACCTACGACTGCCTGCAGTACAAGTACAACCCCTACACCTTCGGCCAGGGCACAAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCACCCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTGCTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGG
TGCACTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTTCCACCCCTGACCCCTGTCCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTCAACCGGGGCGAGTGC

[Figura 35]

Secuencia de nucleótidos de la cadena pesada h198D-H3 (SEQ ID NO: 40)

ATGAAGCACCTGTGGTTCTTTCTGCTGCTGGTGGCCGCTCCAGATGGGTGCTGTCTGAAGT
GCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCTCGTGAAGCCTTCCCAGACCCTGTCTCTGACCTGCA
CCGTGTCCGGCTTCTCCCTGACCTCCTTCCACGTGTCATGGGTCCGACAGCCTCCAGGCAAG
GGCCTGGAATGGATCGCCACCATCTCCTCTGGCGGCGGAACCTACTACAACCCCAGCCTGAA
GTCCAGAGTGACCATCTCCCGGACACCTCCAAGAACCAGGTGTCCCTGAAGCTGTCTCTCCG
TGACCGCCGCTGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGAATCTCCGGCTGGGGCCACTACTAC
GTGATGGACGTGTGGGGCCAGGGCACCTCTGTGACAGTGTCTCTGCTTCCACCAAGGGCCC
CTCCGTGTTTTCTCTGGCCCCCTTCCAGCAAGTCTACCTCCGGCGGAACAGCCGCTCTGGGCT
GCCTCGTGAAAGACTACTTCCCGAGCCCCGTGACCGTGTCTTGGAACCTCTGGCGCTCTGACC
AGCGGCCTGCACACCTTTCCAGCTGTGCTGCTGCTCTCCGGCCTGTACTCCCTGTCCAGCGT
CGTGAAGTGTGCCCTCCAGCTCTCTGGGCAACCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCGGGTGAACCCCAAGTCTGCGACAAGACCCACACCTGT
CCCCCTTGTCTCTGCCCCCTGAAGTGTCTGGGCGGACCTTCCGTGTCTCTGTCTCCCCCAAAGCC
CAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACCCCCGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCCC
ACGAGGACCCTGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAG
ACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACCTCCACCTACCGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTCT
GCACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCTG
CCCCCATGAAAAGAACATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCGGGGAACCCAGGTGTACACA
CTGCCCCCTAGCCGGGAAGAGATGACAAAAATCAGGTGTCACTGACCTGTCTCGTGAAGGG
CTTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGGAATGGGAGTCCAACGGCCAGCCTGAGAACAACTACA
AGACCACCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCTCATTCCTTCTGTACAGCAAGCTGACAGTG
GACAAGTCCCGGTGECAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCCCTGCA
CAACCACTACACCCAGAAGTCCCTGTCCCTGAGCCCCGGCAA

[Figura 36]

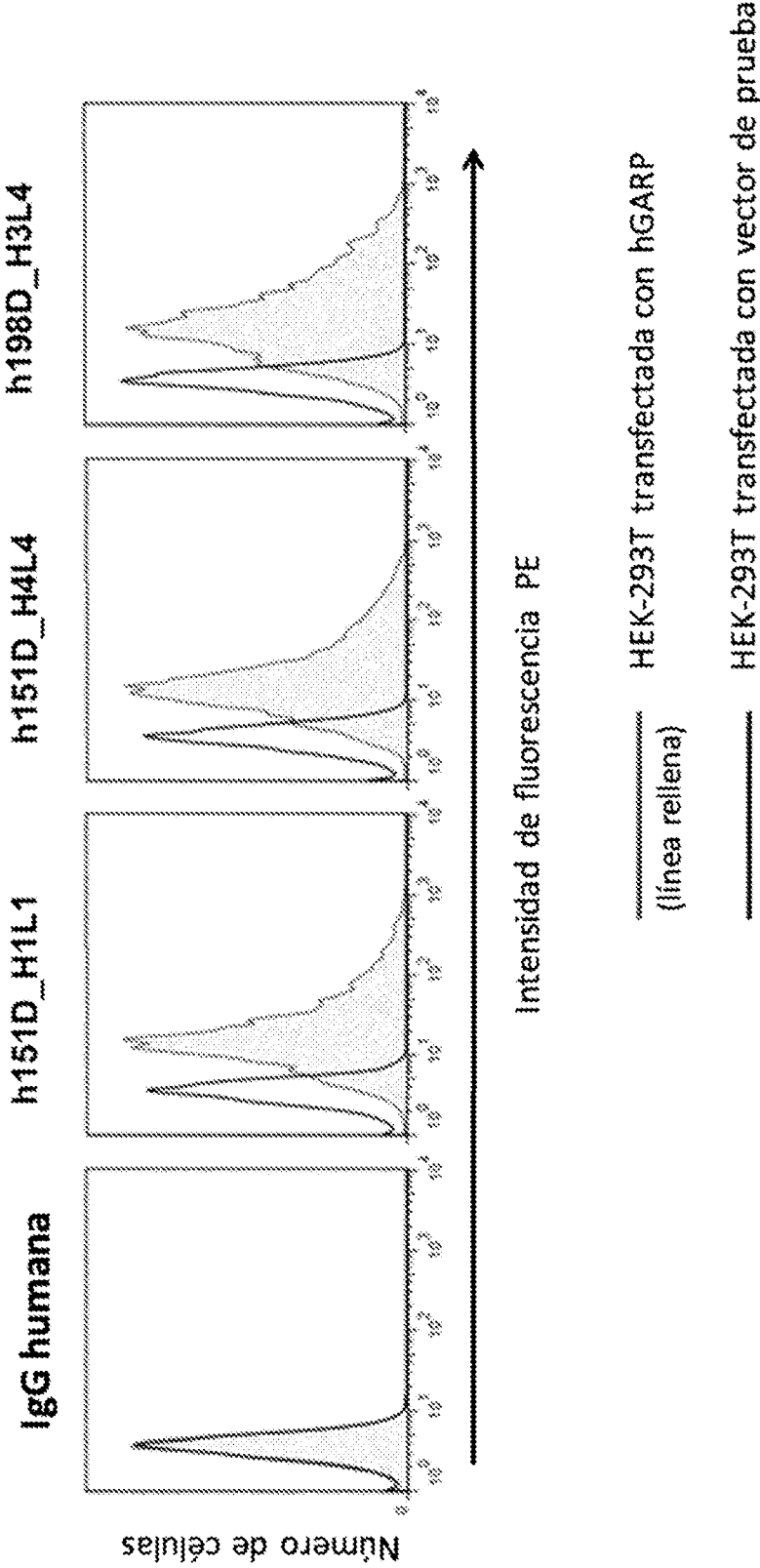
Secuencia de nucleótidos de la cadena ligera h198D-L4 (SEQ ID NO: 42)

```

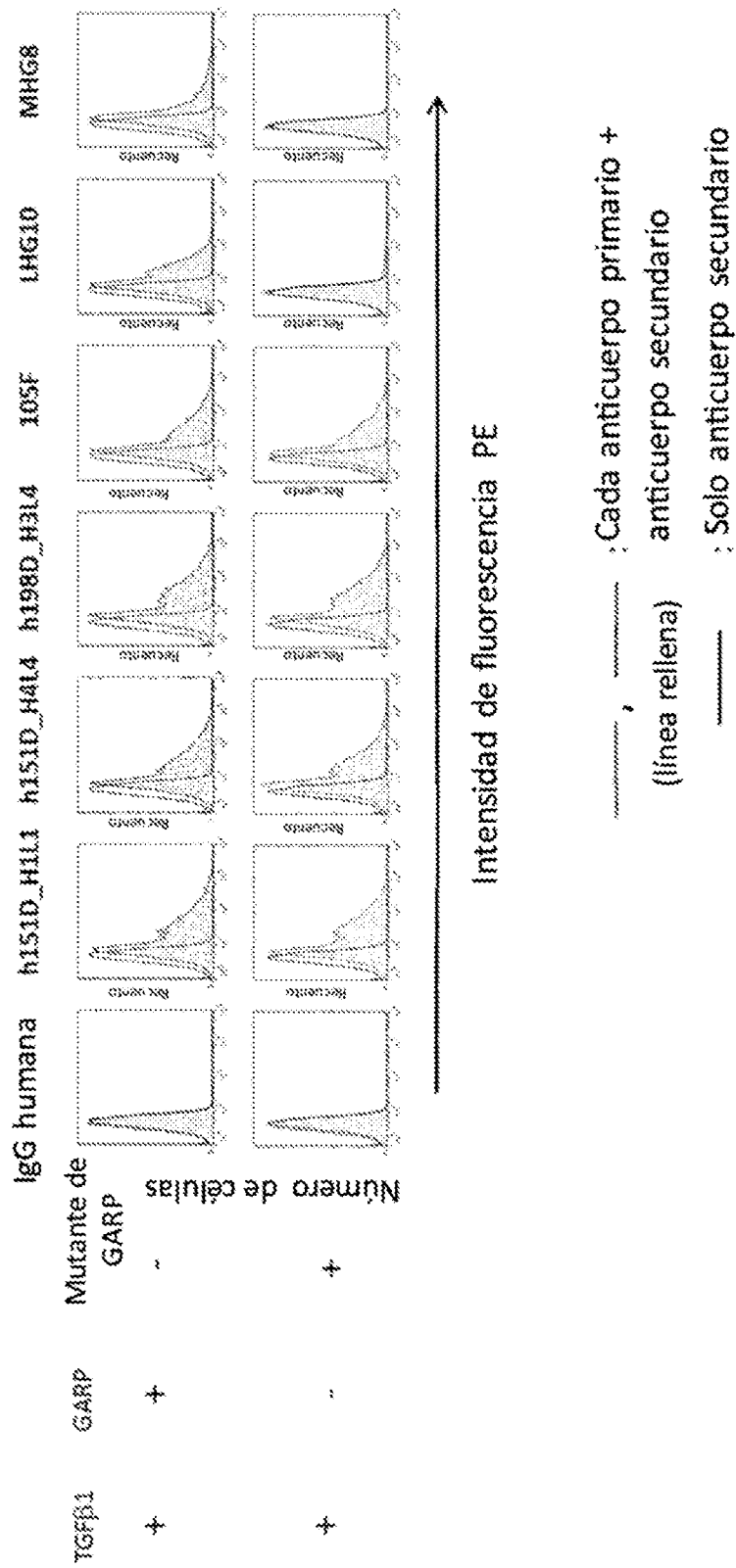
ATGCTGCTGCAGACCCAGGTGTTTCATCTCCCTGCTGCTGTGGATCTCCGGCCGCTACGGCGA
CATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCAGCCTGTCCGCTTCCGTGGGCGACAGAGTGACCATCA
CCTGTCAGGCCTCCGAGGACATCTACTCCGGCCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCCCGCAAG
TCCCCCAAGCTGCTGATCTACGGCGCTGGATCTCTGCAGGACGGCGTGCCCTCTAGATTCTC
CGGCTCTGGATCCGGCACCCTACACCCTGACCATCTCCAGCCTGCAGCCCGAGGACTTCG
CTACCTACTTCTGTCAGCAAGGCCTGAAGTTCCCCCTGACCTTCGGCCAGGGSCACCAAGGTG
GAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCTCCCTCCGTGTTTATCTTCCACCCTCCGACGAGCAGCT
GAAGTCCGGCACAGCTTCTGTCGTGTGCCTGCTGAACAACPTCTACCCCCSCGAGGCCAAGG
TGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCCCTGCAGTCCGGCAACTCCAGGAATCCGTGACCGAGCAG
GACTCCAAGGACAGCACCTACTCCCTGTCTCTACCTGACCTGTCCAAGGCCGACTACGA
GAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAAGTGACCCACCAGGGCCTGTCTAGCCCCGTGACCAAGT
CTTTC AACCGGGGCGAGTGC

```

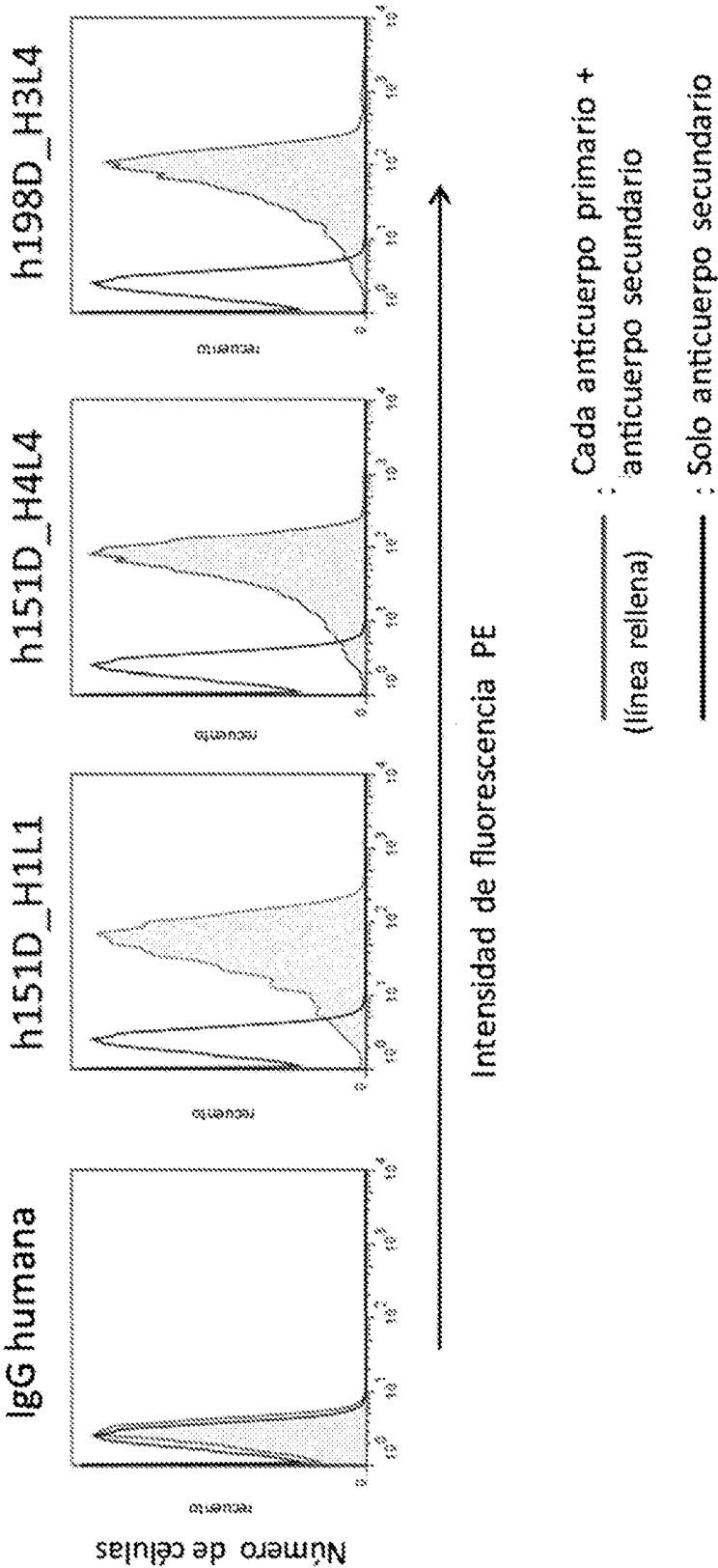
[Figura 37]



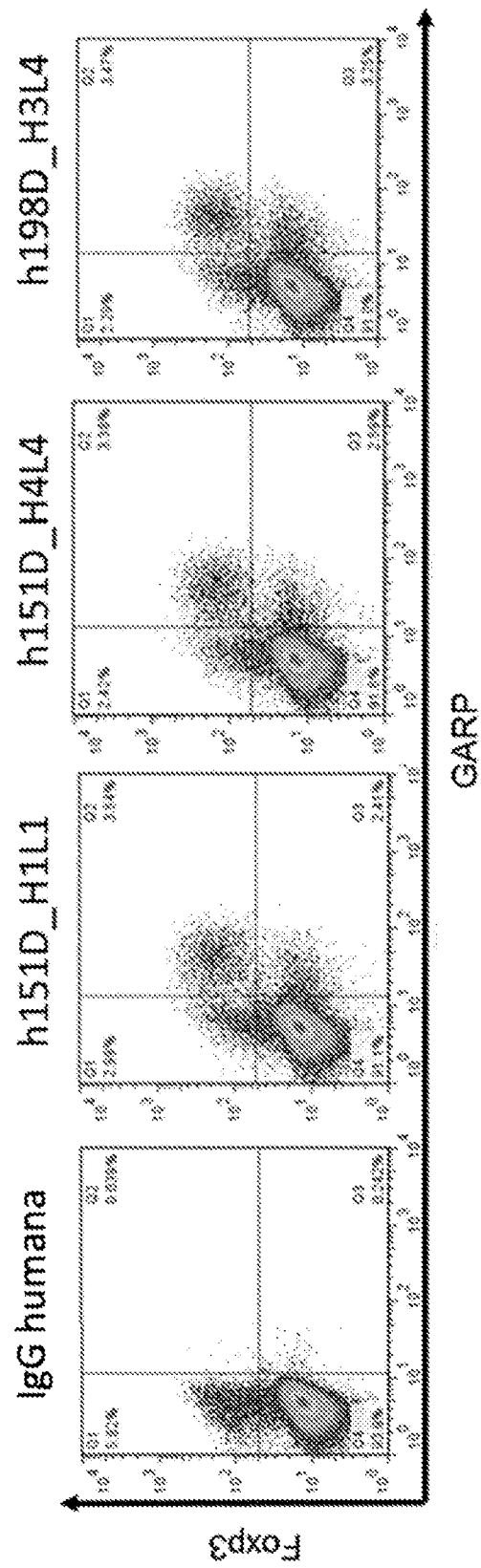
[Figura 38]



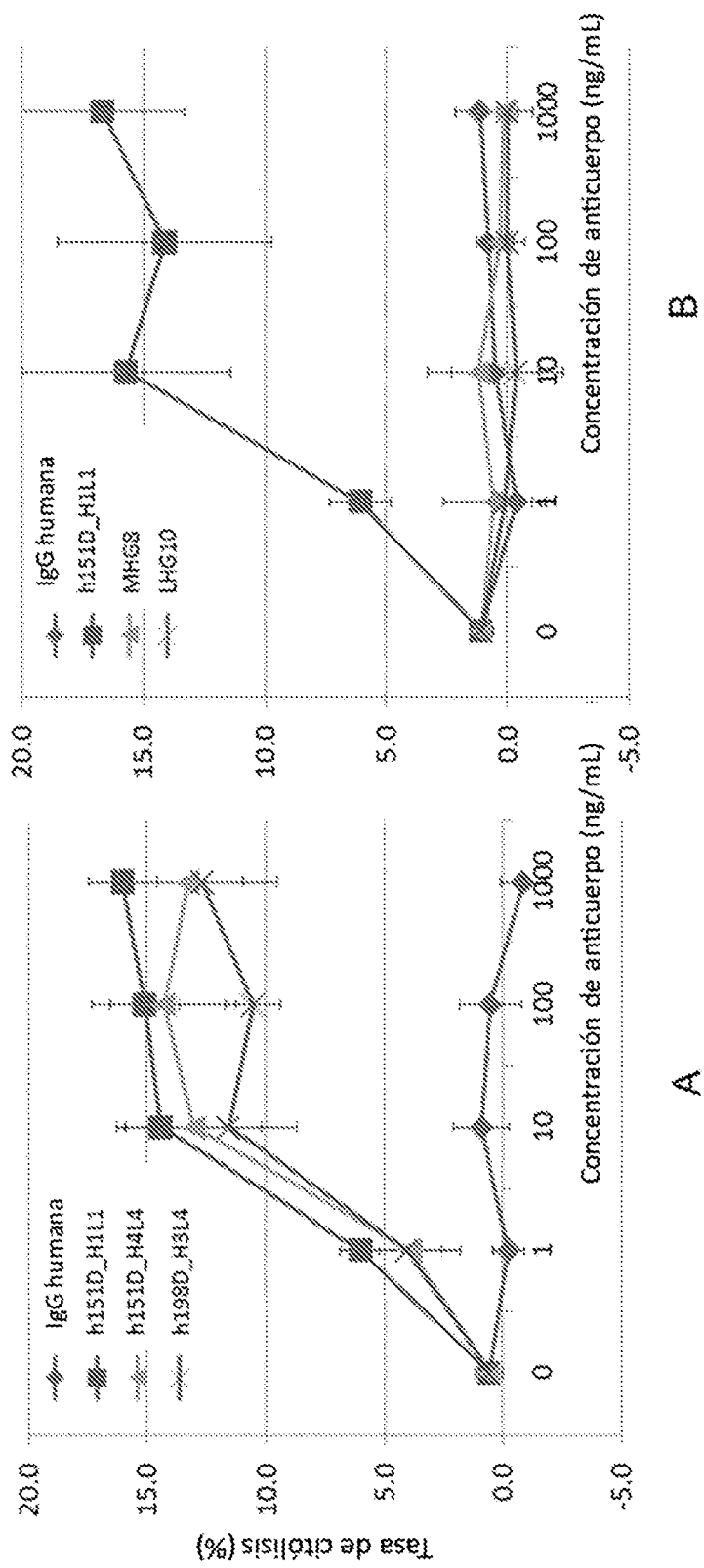
[Figura 39]



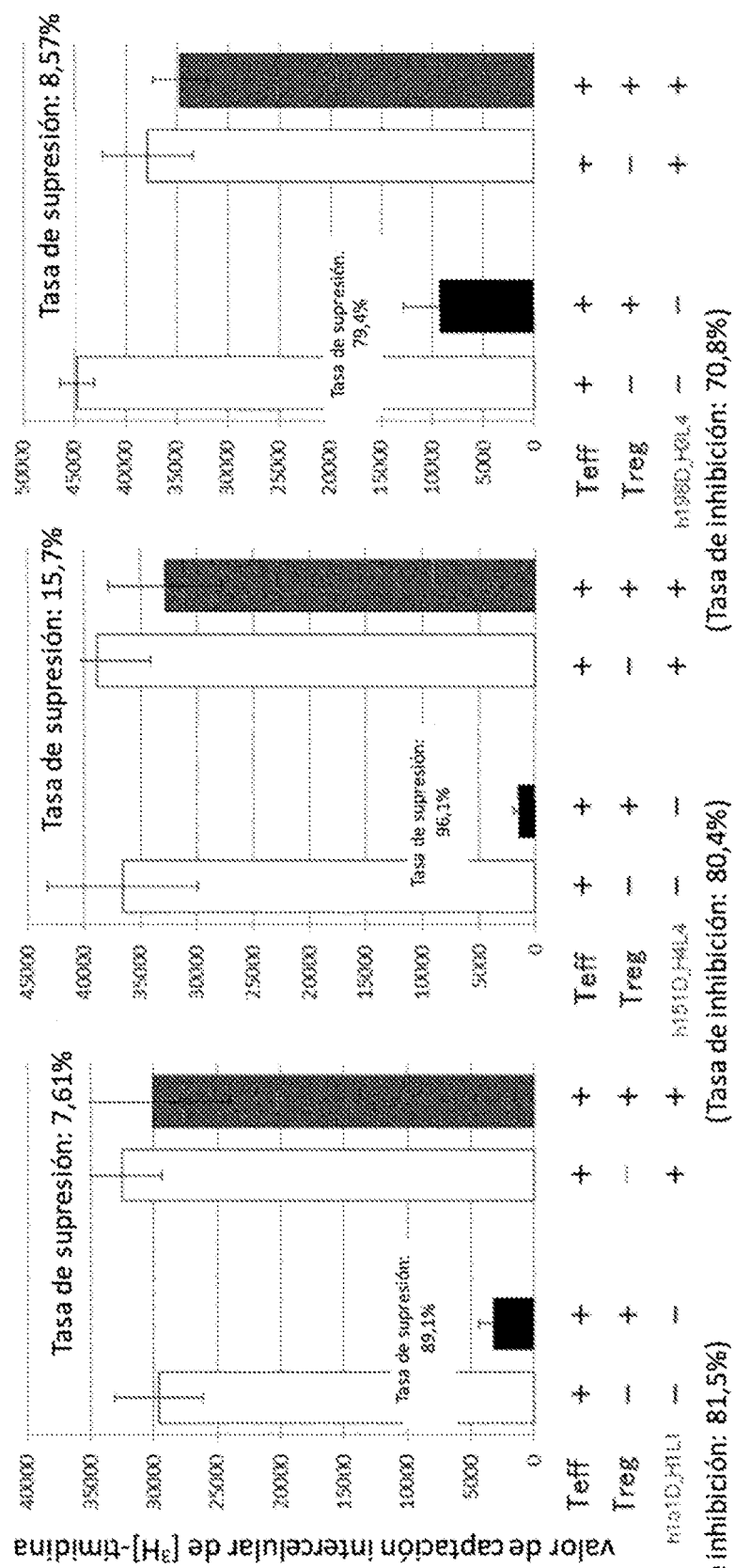
[Figura 40]



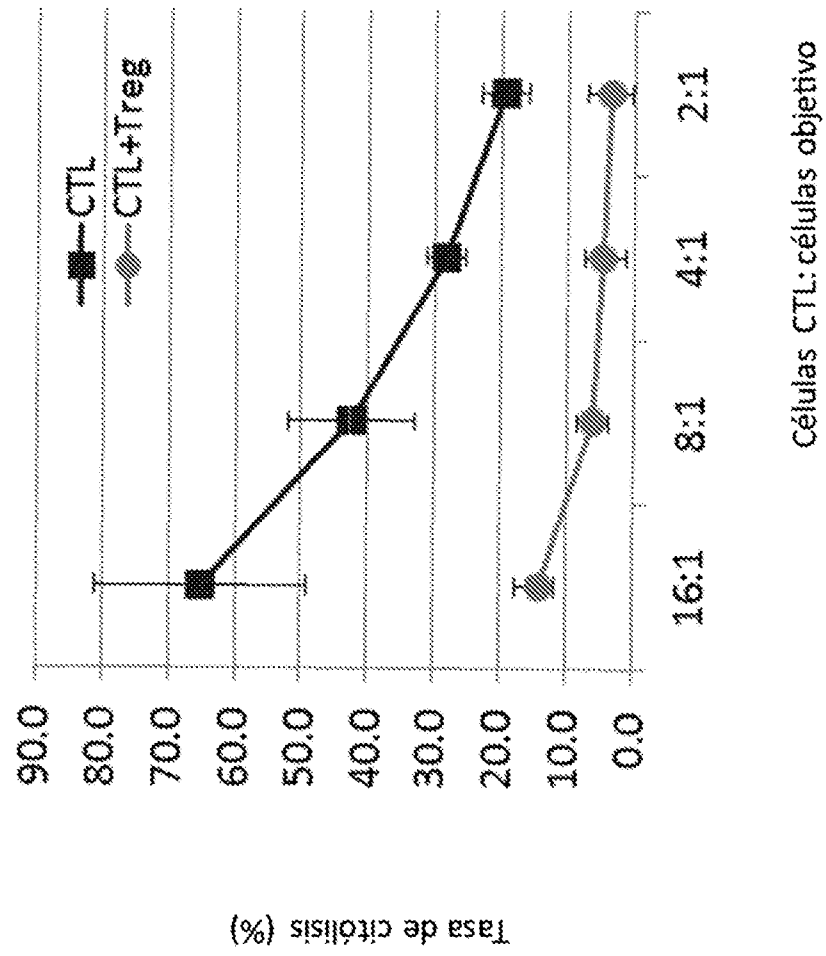
[Figura 41]

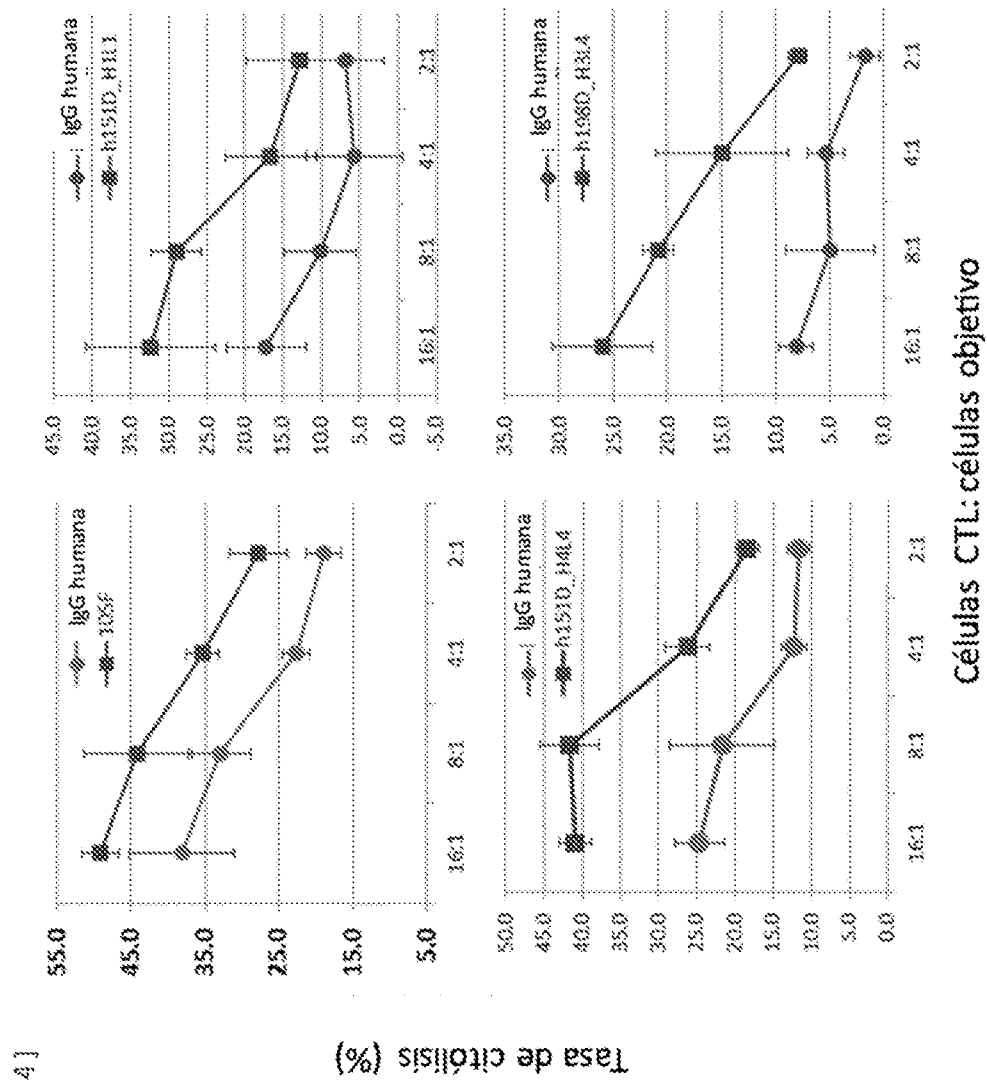


[Figura 42]



[Figura 43]





[Figura 45]

