



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 303 859**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02743765 .6**

86 Fecha de presentación : **28.06.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1422243**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **26.05.2004**

54 Título: **Anticuerpo humanizado contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 y fragmento del anticuerpo.**

30 Prioridad: **28.06.2001 JP 2001-196176**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.09.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.09.2008

73 Titular/es: **Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.**
6-1, Ohtemachi 1-chome
Chiyoda-ku, Tokyo 100-8185, JP

72 Inventor/es: **Shitara, Kenya;**
Nakamura, Kazuyasu;
Hirota, Maiko y
Shimada, Naoki

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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 humanizado contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 y fragmento del anticuerpo.

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a anticuerpos humanizados contra FGF-8 y a sus fragmentos del anticuerpo. Además, la presente invención se refiere a una secuencia de ADN que codifica estos anticuerpos o el fragmento del anticuerpo. La presente invención se refiere a un vector que comprende la secuencia de ADN y una célula huésped transformada por el vector. Además, la presente invención se refiere a un procedimiento de producción de los anticuerpos mencionados anteriormente, o de los fragmentos del anticuerpo que utilizan la célula huésped, y un agente terapéutico y un agente diagnóstico para el cáncer, utilizando los anticuerpos o los fragmentos del anticuerpo.

Antecedentes de la técnica

El factor de crecimiento inducido por los andrógenos (AIGF) es un factor aislado en 1992 a partir de un sobrenadante del cultivo de una progenie celular tumoral mamaria murina SC-3 [*J. Steroid Biochem.*, 27, 459 (1987)], que muestra un crecimiento que depende de las hormonas sexuales. El AIFG es un factor de crecimiento que es inducido y producido por la estimulación androgénica y que activa el crecimiento de las células SC-3 de forma autocrina [*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 89, 8928-8932, (1992)]. Como resultado de la clonación génica, se descubrió que posee una homología del 30 a 40% con la familia del factor de crecimiento fibroblástico (FGF) en la secuencia aminoácida, denominándose FGF-8. A partir de entonces, el gen FGF-8 humano se clonó a partir de una biblioteca genómica placentaria humana utilizando como sonda el gen FGF-8 murino, y demostró su coincidencia con el FGF-8 murino en un 85% en la secuencia nucleótida y en un 100% en la secuencia aminoácida [*FEBS Letters*, 363, 226 (1995)]. Se ha supuesto que los factores de crecimiento inducidos por las hormonas sexuales desempeñarían una función autocrina en cánceres como el cáncer de próstata y el cáncer mamario, que muestran un crecimiento dependiente de las hormonas sexuales, y el hallazgo de FGF-8, aunque en un sistema murino, constituyó la primera evidencia de dicho mecanismo. Se ha supuesto que FGF-8 puede estar relacionado asimismo con la generación y el crecimiento de cánceres en el hombre mediante un mecanismo similar, pero esto no se ha demostrado. Sin embargo, se informó de que cuando se añadió FGF-8, se aceleró el crecimiento de ciertas progenies celulares cancerosas prostáticas humanas [*FEBS Letters*, 363, 226(1995)] se confirmó la expresión de ARNm en diversas líneas celulares cancerosas humanas como el cáncer de próstata, el cáncer de mama y el cáncer de ovario [*Cell Growth & Differ*, 7, 1425 (1996), *Oncogene*, 18, 1053 (1999), *Int. J. Cancer*, 88, 718 (2000)] y el FGF-8 que se encontraba en los tejidos cancerosos humanos del cáncer prostático, cáncer mamario y cáncer ovárico, estaba sobreexpresado, comparado con el FGF-8 presente en los tejidos normales [*Cancer Res.*, 58, 2053, *Oncogene*, 18, 2755 (1999), *Oncogene*, 18, 1053 (1999), *Int. J. Cancer*, 88, 718 (2000)]. Así, tal posibilidad ha señalado que FGF-8 desempeña también un papel autocrino y paracrino sobre el crecimiento dependiente de las hormonas sexuales de las células cancerosas en el hombre. Por otra parte, ya que se ha observado asimismo una expresión de FGF-8 con alta frecuencia en varias células cancerosas prostáticas humanas independientes de las hormonas, en varias células cancerosas mamarias y de los tejidos cancerosos prostáticos [*Cell Growth & Differ*, 7, 1425 (1996), *Oncogene*, 18, 2755 (1999), *Oncogene*, 18, 1053 (1999)], existe una gran posibilidad de que la expresión de FGF-8 esté controlada de manera independiente por las hormonas sexuales. Además, ya que existe un informe con respecto a que el ADN antisentido para FGF-8 inhibió el crecimiento *in vivo* e *in vitro* de una progenie celular cancerosa prostática independiente de las hormonas [*Oncogene*, 16, 1487 (1998)], se sugiere asimismo la presencia de un mecanismo del crecimiento dependiente de FGF-8, en los cánceres que perdieron la dependencia hormonal.

Basándose en estos hechos, los anticuerpos contra FGF-8 resultan efectivos para analizar la función biológica de FGF-8 para las células cancerosas, y asimismo, para diagnosticar las células cancerosas tales como el cáncer prostático y el cáncer mamario, utilizando un procedimiento de detección inmunológica. Además, los anticuerpos neutralizantes que inhiben las funciones de FGF-8, se espera que sean útiles para analizar la función biológica de FGF-8, diagnosticando cánceres como el de próstata, el cáncer mamario y el cáncer ovárico y tratando los cánceres dependientes de las hormonas sexuales y los cánceres independientes de ellas. Así, los inventores de la presente invención llevaron a cabo la preparación de un anticuerpo contra FGF-8, y como resultado, tuvieron éxito en la preparación de un anticuerpo monoclonal murino KM1334 que reacciona específicamente con FGF-8 e inhibe la función de FGF-8 (solicitud de patente japonesa publicada no examinada n° 271391/97. EP-A2- 799 835).

Es conocido sabe, en general, que cuando un anticuerpo derivado de un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo murino, se administra al hombre, es reconocido como una sustancia extraña e induce un anticuerpo humano contra el anticuerpo murino (anticuerpo antimurino humano: que, en adelante, se hace referencia como "HAMA") en el organismo humano. Se conoce que HAMA reacciona con el anticuerpo murino administrado para provocar efectos secundarios [*J. Clin. Oncol.*, 2, 881 (1984), *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 932 (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 1242 (1985)], acelerar la desaparición del anticuerpo murino administrado a partir del organismo [*J. Nucl. Med.*, 26, 1011 (1985), *Blood*, 65, 1349 (1985), *J. Natl. Cancer Inst.*, 80, 937 (1988)], y reducir los efectos terapéuticos del anticuerpo murino [*J. Immunol.*, 135, 1530 (1985). *Cancer Res.*, 46, 6489 (1986)].

Para resolver estos problemas, se ha intentado convertir un anticuerpo derivado de un animal no humano en un anticuerpo humanizado tal como un anticuerpo quimérico humano o un anticuerpo humano en el que se ha injertado CDR, utilizando las técnicas de ingeniería genética.

El anticuerpo quimérico humano está formado por un anticuerpo, la región V, derivada de un anticuerpo animal no humano y la región C derivada de un anticuerpo humano [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 6851 (1984)]. El anticuerpo humano con CDR injertada, está formado por la inserción, en una posición apropiada de un anticuerpo humano, de la secuencia aminoácida de CDR en la región V derivada de un anticuerpo animal no humano [*Nature*, 321, 522 (1986)].

En comparación con los anticuerpos derivados de animales no humanos tales como anticuerpos murinos y similares, estos anticuerpos humanizados tienen varias ventajas en aplicaciones clínicas. Por ejemplo, respecto a la inmunogenicidad y estabilidad en la sangre, se ha informado de que la semivida biológica sanguínea de un anticuerpo quimérico humano alcanzó una duración tan extensa como 6 veces la de un anticuerpo murino cuando se administra al hombre [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86, 4220 (1989)]. En el caso de un anticuerpo humano en el que se ha injertado la secuencia aminoácida CDR, se ha informado de que su inmunogenicidad se redujo y su semivida biológica sérica se prolongó en comparación con un anticuerpo murino en experimentos en los que se utilizaron monos [*J. Immunol.*, 147, 1352 (1991)]. De esta manera, se espera que los anticuerpos humanizados presenten efectos secundarios menores y que sus efectos terapéuticos se prolonguen durante un tiempo mayor que los anticuerpos derivados de animales no humanos.

Además, ya que el anticuerpo humano en el que se injerta CDR se prepara utilizando técnicas de ingeniería genética, pueden prepararse moléculas de varias maneras. Por ejemplo, cuando se utiliza el subtipo 1 como una región C de la cadena H (CH) de un anticuerpo humano, puede prepararse un anticuerpo humanizado que tenga una intensa función efectora tal como una actividad citotóxica mediada celularmente dependiente del anticuerpo [*Cancer Res.*, 56, 1118 (1996)]. Un anticuerpo humanizado con una intensa función efectora es totalmente efectivo cuando existe un antígeno en la superficie de células tales como las células cancerosas y se desea la destrucción de la célula diana. Por otra parte, en el caso en que sólo se requiera la función que neutraliza a la molécula diana, o en el caso en el que pudieran provocarse efectos secundarios por la destrucción de la célula diana, los efectos secundarios pueden evitarse y se espera una semivida biológica prolongada en el suero sanguíneo en comparación con un anticuerpo murino, utilizando el subtipo 4 como CH del anticuerpo humano [*Immunol.*, 85, 668 (1995)], porque el subtipo 4 presenta habitualmente una escasa función efectora [*J. Exp. Med.*, 166, 1351 (1987), *J. Exp. Med.*, 168, 1351 (1998)]. Además, según recientes avances en ingeniería proteica y en ingeniería genética, los fragmentos de anticuerpo que tengan un peso molecular más pequeño tal como Fab, Fab', F(ab')₂, scFv [*Science*, 242, 423 (1988)], diacuerpo. [*Nature Biotechnol.*, 15, 629 (1997)], dsFv [*Molecular Immunol.*, 32, 249 (1995)] y un CDR conteniendo un péptido (*J. Biol. Chem.*, 271, 2966) (1996)], pueden prepararse como anticuerpos humanizados. Los fragmentos de anticuerpo son excelentes en la actividad transicional al tejido diana, en comparación con las moléculas del anticuerpo completo [*Cancer Res.*, 52, 3402 (1992)].

Se considera que los anticuerpos humanizados resultan más preferidos que los anticuerpos derivados de los animales no humanos como los anticuerpos murinos, cuando se utilizan en aplicaciones clínicas en el hombre.

Tal como se ha considerado anteriormente, si los anticuerpos humanizados que reaccionan específicamente con FGF-8 e inhiben la función de FGF-8 o sus fragmentos de anticuerpo, son preparados, se espera que se utilicen como agentes diagnósticos efectivos o agentes terapéuticos para enfermedades relacionadas con el FGF-8, tales como el cáncer. Sin embargo, dichos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo no se han preparado todavía hasta la fecha.

Exposición de la invención

Un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar los anticuerpos humanizados o sus fragmentos, tal como se caracteriza en las reivindicaciones. Ellos reaccionan específicamente con FGF-8, que se considera un factor de crecimiento del cáncer prostático, del cáncer mamario, del cáncer ovárico y similares, y que inhiben además la función biológica de FGF-8.

En la presente invención se obtuvo el ADNc de cadena H y el ADNc de cadena L del anticuerpo a partir de un hibridoma KM1334 (FERM BP-5451) que produce un anticuerpo murino contra FGF-8 que pertenece al subtipo IgG1, y se descubrió que las regiones V y CDR constituían nuevas secuencias aminoácidas, y se expresó y purificó un anticuerpo quimérico anti-FGF-8 humano y un anticuerpo anti-FGF-8 humano en el que se injertaba la secuencia aminoácida CDR, clonando los ADNc que codifican las nuevas regiones V o VH y VL que comprenden los CDR en un vector de expresión para las células animales, que comprende ADNc que codifican CH de un anticuerpo humano y la región C de la cadena L (CL) de un anticuerpo humano, para construir de este modo un vector para la expresión del anticuerpo humanizado e introduciendo entonces el vector para la expresión del anticuerpo de expresión en una célula animal. Así, la presente invención se lleva a cabo proporcionando las formas de realización caracterizadas en las reivindicaciones.

De este modo, la presente invención se refiere a anticuerpos humanizados, que reaccionan específicamente con FGF-8 e inhiben la función biológica de FGF-8, o de sus fragmentos del anticuerpo.

La función biológica de FGF-8 incluye la actividad aceleradora del crecimiento independiente y dependiente de las hormonas sexuales para varias células cancerosas, tales como las células del cáncer prostático, cáncer mamario y cáncer ovárico [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 89, 8928 (1992)], la función de vascularización [*Oncogene*, 20, 2791 (2001)], y la función en el desarrollo de la artrosis [*Development*, 127, 2471 (2000), *Nature Genet.*, 26, 460 (2000)].

Un anticuerpo quimérico humano es un anticuerpo que comprende VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, y CH y CL de un anticuerpo humano. El animal no humano puede ser cualquiera de entre ratón, rata, hámster, conejo y similares, siempre que a partir de ellos pueda prepararse un hibridoma.

El anticuerpo quimérico humano de la presente invención puede producirse obteniendo ADNc que codifican VH y VL a partir de hibridomas, que producen un anticuerpo monoclonal que reacciona específicamente con FGF-8, insertando los ADNc en un vector de expresión para la célula animal, que poseen genes que codifican un anticuerpo humano CH y un anticuerpo humano CL, para construir un vector para la expresión del anticuerpo quimérico humano, introduciendo el vector en una célula animal para expresar el anticuerpo.

Puede utilizarse cualquier CH de un anticuerpo quimérico humano, siempre que pertenezca a la inmunoglobulina humana (hIg), prefiriéndose los del tipo hIgG, pudiéndose utilizar cualquiera de los subtipos que pertenezcan además a hIgG, tales como $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$. Asimismo, cualquier CL de un anticuerpo quimérico humano puede utilizarse, siempre que pertenezca a hIg, y pueden utilizarse los del tipo κ o λ .

El anticuerpo quimérico humano que reacciona específicamente con FGF-8 (anticuerpo quimérico anti-FGF-8) incluye un anticuerpo quimérico humano que comprende una región que determina complementariedad (a la que en adelante se hará referencia como "CDR") 1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena pesada del anticuerpo (cadena H), que comprende las secuencias aminoácidas que se representan en SEC ID nº 5, 6, y 7, respectivamente, y/o que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de una región variable (región V) de una cadena ligera (cadena L) del anticuerpo, que comprende las secuencias aminoácidas representadas por SEC ID nºs 8, 9 y 10, respectivamente, y preferentemente, un anticuerpo quimérico humano en el que VH comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 40 y/o VL comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 41. Los ejemplos incluyen el anticuerpo KM3034 en el que VH del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 40, CH del anticuerpo humano comprende una secuencia aminoácida del subtipo $\gamma 1$, VL del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 41 y CL del anticuerpo humano comprende una secuencia aminoácida del tipo κ .

Un anticuerpo humano en el que se ha injertado CDR, es un anticuerpo en el que las secuencias aminoácidas CDR de VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, se injertan en posiciones apropiadas de VH y VL de un anticuerpo humano.

El anticuerpo humano en el que se ha injertado CDR de la presente invención puede obtenerse injertando las secuencias CDR de VH y VL de un anticuerpo que reaccione específicamente con FGF-8 de un animal no humano, en FR en VH y VL de cualquier anticuerpo humano, para construir ADNc que codifiquen regiones V que se hayan obtenido insertando los ADNc en un vector de expresión para la célula animal, que posea ADN que codifiquen CH y CL de un anticuerpo humano, para construir un vector para la expresión del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, e introduciéndolo entonces en una célula animal, para expresar el anticuerpo.

Cualquier CH del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR puede utilizarse, siempre que pertenezca a hIg, pero son preferidos los del tipo hIgG, pudiendo utilizarse cualquiera de los subtipos que pertenezcan además a hIgG tales como $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$ y $\gamma 4$. Asimismo, puede utilizarse cualquier CL del anticuerpo humano en el que se haya insertado CDR, siempre que pertenezca a hIg, pudiendo utilizarse los del tipo κ o del tipo λ .

El anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR que reacciona específicamente con FGF-8 (anticuerpo anti-FGF-8 en el que se ha insertado CDR) incluye un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo VH que comprende las secuencias aminoácidas representadas por SEC ID nº: 5, 6 y 7, respectivamente, y/o comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo VL que comprende las secuencias aminoácidas representadas por SEC ID nºs 8, 9 y 10, respectivamente, preferentemente un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en que VH comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 16 y/o VL comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 17, y más preferentemente un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VH del anticuerpo comprende una secuencia aminoácida en la que por lo menos un residuo aminoácido seleccionado de entre Lys en posición 12, Lys en posición 13, Ala en posición 40, Pro en posición 41, Met en posición 48, Val en posición 68, Ile en posición 70, Thr en posición 74, Thr en posición 76, Glu en posición 82, Ser en posición 84, Arg en posición 87 y Tyr en posición 95 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 16, es sustituida con otro residuo aminoácido, un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VL del anticuerpo comprende una secuencia aminoácida en la que por lo menos un residuo aminoácido seleccionado de entre Ile en posición 2, Val en posición 3, Thr en posición 14, Pro en posición 15, Gln en posición 50, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 17, es sustituido con otro residuo aminoácido, y un aminoácido humano en el que se ha insertado CDR, en el cual VH del anticuerpo comprende una secuencia aminoácida en la que por lo menos un residuo aminoácido seleccionado de entre Lys en posición 12, Lys en posición 13, Ala en posición 40, Pro en posición 41, Met en posición 48, Val en posición 68, Ile en posición 70, Thr en posición 74, Thr en posición 76, Glu en posición 82, Ser en posición 84, Arg en posición 87 y Tyr en posición 95 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 16, es sustituido con otro aminoácido, y en el que VL del anticuerpo comprende una secuencia aminoácida en la que por lo menos un residuo aminoácido seleccionado de entre Ile en posición 2, Val en posición 3, Thr en posición 14, Pro en posición 15, Gln en posición 50, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 17, es sustituido con otro aminoácido. Ejemplos de VH incluyen la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 18 en la que seis residuos de Lys en posición 12, Lys en posición 13, Ala en posición 40, Pro en posición 41, Met en posición 48 y Tyr en posición 95 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 16, son modificados con Ala, Arg, Ser, Ile y Phe, respectivamente. Los ejemplos de VL incluyen la secuencia aminoácida representada por SEC ID nº: 19, en la que seis residuos de Ile en posición 2, Thr en posición 14, Pro en posición 15, Gln en posición 50, Leu en posición 51

y Tyr en posición 92 en la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 17, son modificados con Val, Ser, Leu, Lys, Val y Phe, respectivamente, la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 38 en la que cuatro residuos de Thr en posición 14, Pro en posición 15, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, son modificados con Ser, Leu, Val y Phe, respectivamente, y la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 39 en la que tres residuos de Ile en posición 2, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, son modificados con Val, Val y Phe, respectivamente.

Los ejemplos incluyen un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VH del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16 ó 18, un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VL del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 17, 19, 38 ó 39, un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, en el que VH y VL del anticuerpo comprenden las secuencias representadas por SEC ID n°: 16 ó 18 y SEC ID n°: 17, 19, 38 ó 39, respectivamente, y similares, preferentemente un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VH y VL del anticuerpo comprenden la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16 y SEC ID n°: 19, respectivamente, un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VH y VL del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16 y SEC ID n°: 38, respectivamente, y un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR en el que VH y VL del anticuerpo comprenden la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16 y SEC ID n°: 39, respectivamente.

El fragmento de anticuerpo de la presente invención comprende Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv y un CDR conteniendo un péptido, y similares.

Un Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50.000 y una actividad de unión antigénica, en el que aproximadamente la mitad del lado N-terminal de la cadena H y la cadena L entera, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, papaína (sección en un residuo aminoácido en posición 224 de la cadena H), se unen juntos mediante un enlace disulfuro (enlace S-S).

El Fab de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR de la presente invención, que reacciona específicamente con FGF-8, con una proteasa, papaína. Asimismo, el Fab puede obtenerse insertando ADN que codifique Fab del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas, o en un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar el Fab.

Un F(ab')₂ es un fragmento de anticuerpo que posee un peso molecular de aproximadamente 100.000 y una actividad de unión antigénica, que es ligeramente más acentuada que la del Fab, mediante un enlace S-S de la región bisagra, entre los fragmentos obtenidos tratando IgG con una proteasa, pepsina (sección en el residuo aminoácido en posición 234 en la cadena H).

El F(ab')₂ de la presente invención puede obtenerse tratando un anticuerpo que reacciona específicamente con FGF-8 con una proteasa, pepsina. Asimismo, el F(ab')₂ puede ser producido uniendo el Fab' que se describe a continuación mediante un enlace tioéter o un enlace S-S.

Un Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 5.000 y una actividad de unión antigénica, que se obtiene seccionando un enlace S-S de la región bisagra del F(ab')₂ mencionado anteriormente.

El Fab' de la presente invención puede obtenerse tratando F(ab')₂ que reacciona específicamente con FGF-8, con un agente reductor, ditiotretol. Asimismo, el Fab' puede producirse insertando ADN que codifique el Fab' del anticuerpo en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar el Fab'.

Un scFv es un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH en el cual una cadena VH y una cadena VL están unidas utilizando un engarce peptídico apropiado (P) de 12 o más residuos y que posee una actividad de unión antigénica.

El scFv de la presente invención puede producirse obteniendo ADNc que codifiquen VH y VL de un anticuerpo que reaccione específicamente con FGF-8, construyendo ADN que codifique el scFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el scFv.

Un fragmento dimérico de anticuerpo es un fragmento de anticuerpo en el que los scFv que tienen la misma o distinta especificidad de unión antigénica forman un dímero, poseyendo una actividad de unión antigénica divalente para idéntico antígeno o dos actividades de unión antigénica específicas para diferentes antígenos.

El fragmento dimérico de anticuerpo de la presente invención, por ejemplo, un fragmento dimérico de anticuerpo divalente que reacciona específicamente con FGF-8, puede producirse obteniendo ADNc que codifiquen VH y VL del anticuerpo, construyendo ADN que codifique scFv que posea un engarce polipeptídico de 3 a 10 residuos, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el fragmento dimérico de anticuerpo.

Un dsFV se obtiene uniendo polipéptidos en los que un residuo aminoácido de cada VH y VL es sustituido con un residuo de cisteína mediante un enlace S-S entre los residuos de cisteína. El residuo aminoácido que es sustituido

con un residuo de cisteína pueden seleccionarse basándose en una estimación de la estructura tridimensional del anticuerpo, según el procedimiento que se muestra por Reiter *et al* [*Protein Engineering*, 7, 697 (1994)].

El dsFv de la presente invención puede producirse obteniendo los ADNc que codifiquen VH y VL de un anticuerpo que reacciona específicamente con FGF-8, construyendo un ADN que codifique el dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión para procariotas o en un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el dsFv.

Un CDR que comprende un péptido se constituye incluyendo por lo menos una región del CDR de VH o VL. Los CDR plurales que comprenden péptidos pueden prepararse uniéndolos directamente o mediante un apropiado engarce peptídico.

El CDR que comprende el péptido de la presente invención puede producirse construyendo ADNc que codifiquen CDR de VH y VL de un anticuerpo que reacciona específicamente con FGF-8, o insertando los ADNc en un vector de expresión para procariotas o en un vector de expresión para eucariotas, e introduciendo entonces el vector de expresión en un procariota o eucariota para expresar el péptido. Asimismo, el CDR que comprende el péptido puede también producirse mediante procedimiento de síntesis química tal como un procedimiento Fmoc (procedimiento del fluorenilmetoxicarbonil), un procedimiento tBoc (procedimiento t-butiloxicarbonil), o similares.

Un procedimiento para producir el anticuerpo quimérico humano, el anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, y el fragmento del anticuerpo, que reaccionan específicamente con FGF-8 e inhiben la función de FGF-8, un procedimiento para evaluar la actividad y un procedimiento para utilizarlos, se explican a continuación.

1. Producción del anticuerpo quimérico humano y del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR

(1) Construcción del vector para la expresión del anticuerpo humanizado

Un vector para la expresión del anticuerpo humanizado es un vector de expresión para una célula animal, en el que se han insertado los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, construyéndose clonando cada uno de los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano en un vector de expresión para la célula animal.

La región C de un anticuerpo humano puede ser CH y CL de cualquier anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen CH que pertenece al tipo $\gamma 1$ y CL que pertenece al tipo κ de un anticuerpo humano, y similares. Como ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, pueden utilizarse un ADN cromosómico que comprende un exón y un intrón o ADNc. Como vector de expresión para la célula animal, puede utilizarse cualquier vector de expresión, siempre que una región C de un anticuerpo humano pueda insertarse y expresarse en él. Ejemplos incluyen pAGE107 [*Cytotechnology*, 3, 133 (1990)], pAGE103 [*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)], pHSG274 [*Gene*, 27, 223 (1984)], pKCR [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 1527 (1981)], pSGI β d2-4 [*Cytotechnology*, 4, 173 (1990)], pSE1 UK1Sed1-3 [*Cyto-technol.*, 13, 79 (1993)] y similares. Ejemplos de un promotor y potenciador utilizado para un vector de expresión para una célula animal, incluyen un potenciador y promotor temprano SV40 [*J. Biochem.*, 101, 1307 (1987)], un potenciador y promotor LTR del virus Moloney de la leucemia murina [*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 149, 960 (1987)], un promotor inmunoglobulínico de cadena H [*Cell*, 41, 479 (1985)] y potenciador [*Cell*, 33, 717 (1983)], y similares.

El vector para la expresión del anticuerpo humanizado puede ser, bien de un tipo en el que la cadena H y la cadena L del anticuerpo existan en vectores separados, o de un tipo en el que ambas cadenas existan en el mismo vector (tipo tándem). Con respecto a la facilidad de construcción de un vector para la expresión del anticuerpo humanizado, la facilidad de introducción en las células animales, y el equilibrio entre las cuantías de la expresión de la cadena H y de la L del anticuerpo en las células animales, resulta preferido un tipo tándem del vector para la expresión del anticuerpo humanizado [*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)]. Los ejemplos del tipo tándem del vector para la expresión del anticuerpo humanizado incluyen pKANTEX93 (WO97/10354), pEE18 [HYBRIDOMA, 17, 559 (1998)], y similares.

El vector construido para la expresión del anticuerpo humanizado puede utilizarse para la expresión de un anticuerpo quimérico humano y de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, en las células animales.

(2) Preparación del ADNc que codifica la región V del anticuerpo derivado del animal no humano y análisis de la secuencia aminoácida

Los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo animal no humano tal como un anticuerpo murino, se obtienen de la manera siguiente:

El ARNm se extrae de células de hibridoma que producen un anticuerpo murino o similar, que sintetiza ADNc. El ADNc sintetizado se inserta en un vector tal como un fago o un plásmido para preparar una biblioteca de ADNc. Cada uno de un fago recombinante o de un plásmido recombinante que contiene ADNc que codifica VH y de un fago recombinante o plásmido recombinante que contiene ADNc que codifica VL, se aísla de la biblioteca utilizando una parte de la región C o de la región V de un anticuerpo murino como una sonda. Las secuencias nucleótidas completas de VH y VL del anticuerpo murino de interés, se determinan en el fago recombinante o en el plásmido recombinante, y las secuencias aminoácidas completas de VH y VL se deducen a partir de las secuencias nucleótidas.

El animal no humano puede ser cualquier animal tal como el ratón, la rata, el hamster o el conejo, siempre que pueda producirse a partir de ellos un hibridoma.

El procedimiento para preparar un ARN total a partir de un hibridoma incluye un procedimiento de tiocianato de guanidina-trifluoroacetato de cesio [*Methods in Enzymol.*, 154, 3 (1987)] y similares. El procedimiento para preparar ARNm a partir del ARN total incluye un procedimiento de columna de celulosa oligo (dT) inmovilizada [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)] y similares. Asimismo, un equipo para preparar ARNm a partir de una célula de hibridoma incluye el Equipo de Aislamiento Rápido de la Pista del ARNm (preparado por Invitrogen), y el Equipo de Purificación Rápido de la Preparación de ARNm (preparado por Pharmacia) y similares.

El procedimiento para sintetizar ADNc y preparar una biblioteca de ADNc incluye procedimientos convencionales [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34]; un procedimiento que utiliza un equipo comercialmente disponible tal como el Sistema Plasmídico Super Script™ para la síntesis del ADNc y la Clonación plasmídica (preparado por GIBCO BRL), el equipo ZAP-ADNc (preparado por Stratagene), y similares.

Cualquier vector en el que el ADNc sintetizado utilizando ARNm extraído de un hibridoma como matriz, puede insertarse para preparar una biblioteca de ADNc, siempre que el ADNc pueda insertarse. Los ejemplos incluyen ZAP Express [*Strategies*, 5, 58 (1992)], pBluescript II SK(+) [*Nucleic Acids Research*, 17, 9494 (1989)], λzapII (preparado por Stratagene), λgt10 y λgt11 [*DNA Cloning: A Practical Approach*, 1, 49 (1985)], Lambda BlueMid (preparado por Clontech), λExcell y pT7T3 18U (preparado por Pharmacia), pcD2 [*Mol. Cell. Biol.*, 3, 280 (1983)], pUC18 [*Gene*, 33, 103 (1985)] y similares.

Puede utilizarse cualquier *E. coli* para introducirlo en la biblioteca de ADNc construida mediante un fago o vector plasmídico, siempre que la biblioteca de ADNc pueda someterse a introducción, expresarse y conservarse. Los ejemplos incluyen XL1-Blue MRF' [*Strategies*, 5, 81 (1992)], C600 [*Genetics*, 39, 440 (1954)], Y1088 y Y1090 [*Science*, 222, 778 (1983)], NM522 [*J. Mol. Biol.*, 166, 1 (1983)], K802 [*J. Mol. Biol.*, 16, 118 (1966)], JM105 [*Gene*, 38, 275 (1985)] y similares.

Para seleccionar clones de ADNc que codifiquen VH y VL de un anticuerpo derivado a partir de un animal no humano en la biblioteca de ADNc, puede utilizarse un procedimiento de hibridación en placa o uno colonial, utilizando una sonda marcada isotópicamente o fluorescentemente [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)]. Asimismo, los ADNc que codifican VH y VL pueden prepararse mediante la reacción en cadena de la polimerasa [PCR, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989); *Current Protocols in Molecular Biology*, Suplemento 1-34] preparando cebadores y utilizando ADNc preparado a partir de ARNm o una biblioteca de ADNc como matriz.

La secuencia nucleótida del ADNc puede determinarse sometiendo a digestión el ADNc seleccionado mediante el procedimiento anterior con enzimas de restricción apropiados y similares, clonando los fragmentos en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (preparado por Stratagene), llevando a cabo la reacción mediante un procedimiento de análisis de nucleótidos que se utilice habitualmente, tal como el procedimiento dideoxi de Sanger, F. *et al.*, [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463 (1977)], y analizando entonces la secuencia utilizando un analizador secuencial automático tal como ABI377 (fabricado por Applied Biosystems) o similar.

Puede confirmarse si los ADNc codifican las secuencias aminoácidas completas de VH y VL del anticuerpo que contiene una secuencia señal secretora, estimando las secuencias aminoácidas completas de VH y VL a partir de la secuencia nucleótida determinada, y comparándolas con las secuencias aminoácidas completas de VH y VL de anticuerpos conocidos [*Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)]. La longitud de la secuencia señal secretora y la secuencia aminoácida N-terminal pueden deducirse comparando las secuencias aminoácidas completas de VH y de VL del anticuerpo que comprende una secuencia señal secretora con secuencias aminoácidas completas de VH y de VL de anticuerpos conocidos [*Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)], pudiéndose conocer el subgrupo al que pertenecen. Además, puede identificarse la secuencia aminoácida de cada uno de los CDR de VH y VL.

Además, lo novedoso de la secuencia puede examinarse llevando a cabo una búsqueda de homología con las secuencias en cualquier base de datos, por ejemplo, SWISS-PROT, PIR-Proteína o similares, utilizando las secuencias aminoácidas completas de VH y VL, por ejemplo, según el procedimiento BLAST [*J. Mol. Biol.*, 215, 403 (1990)] o similar.

(3) Construcción del vector de expresión del anticuerpo quimérico humano

Puede construirse un vector de expresión de un anticuerpo quimérico humano clonando ADNc que codifiquen VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano, por encima de los ADN que codifican CH y CL de un anticuerpo humano, en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado, tal como se describe en el apartado 1(1). Por ejemplo, utilizando un plásmido que comprenda ADNc que codifiquen VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano como matriz, los VH y VL del anticuerpo son amplificados mediante PCR, utilizando cebadores en el lado 5'-terminal y en el lado 3' terminal, que comprenden una secuencia de reconocimiento de una enzima de res-

tricción apropiada, y una secuencia nucleótida que codifica la región V, clonándose el producto amplificado respectivo en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (preparado por Stratagene), determinando la secuencia nucleótida según el procedimiento descrito en el apartado 1(2), obteniéndose de este modo un plásmido que comprende las secuencias del ADN que codifican las secuencias aminoácidas de VH y VL del anticuerpo deseado. Los ADNc que codifican las secuencias aminoácidas de VH y VL del anticuerpo, se aíslan a partir del plásmido y se clonan de forma que se expresen en forma apropiada por encima de los genes que codifican las regiones C de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo humano en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado que se describe en el apartado 1(1), para construir, por consiguiente, un vector para la expresión de un anticuerpo quimérico humanizado.

(4) Construcción del ADNc que codifica la región V del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR

Los ADNc que codifican VH y VL de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, pueden obtenerse de la siguiente manera. En primer lugar, las secuencias aminoácidas de FR en VH y VL de un anticuerpo humano en las que se injertan las secuencias aminoácidas de CDR en VH y en VL de un anticuerpo derivado de un anticuerpo animal no humano, son seleccionadas. Pueden utilizarse cualesquiera secuencias aminoácidas de FR en VH y VL de un anticuerpo humano, siempre que se deriven de un anticuerpo humano. Los ejemplos incluyen secuencias aminoácidas de FR en VH y VL de anticuerpos humanos registrados en bases de datos tales como Protein Data Bank, y secuencias aminoácidas que son comunes a los subgrupos de FR en VH y VL de anticuerpos humanos [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept Health and Human Services (1991)], y similares. De entre éstas, para producir un anticuerpo humano en el que se insertan CDR que posea una actividad potente, se seleccionan preferentemente las secuencias aminoácidas que presenten una alta homología (por lo menos un 60% o más) con la secuencia aminoácida de FR en VH y VL de un anticuerpo diana derivado de un animal no humano.

Entonces, las secuencias aminoácidas de CDR en VH y VL del anticuerpo derivado de un animal no humano, se injertan en las secuencias aminoácidas seleccionadas de FR en VH y VL de un anticuerpo humano, para diseñar las secuencias aminoácidas de VH y VL de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR. Las secuencias aminoácidas que se han diseñado se convierten a secuencias nucleótidas considerando la frecuencia de utilización de los codones que se han encontrado en las secuencias nucleótidas de genes que codifican los anticuerpos [*Sequence of Proteins of Immunological Interest*, US Dept Health and Human Services (1991)], diseñándose las secuencias de ADN que codifican las secuencias aminoácidas de VH y VL de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR. Varios ADN sintéticos que poseen una longitud de aproximadamente 100 nucleótidos se sintetizan, basándose en las secuencias nucleótidas que se han diseñado, llevándose a cabo una PCR utilizándolos. En este caso, se prefiere, en cada uno de VH y VL, que se diseñen 6 ADN sintéticos en vista de la eficiencia reaccional de PCR y de las longitudes de los ADN que pueden sintetizarse. Además, pueden clonarse fácilmente en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado construido en el apartado 1(1), introduciendo la secuencia de reconocimiento de una apropiado enzima de restricción en el extremo 5' de los ADN sintéticos que se encuentran en ambos extremos. Después de la PCR, un producto amplificado es clonado en un plásmido tal como pBluescript SK(-) (preparado por Stratagene) y las secuencias nucleótidas se determinan según el procedimiento que se describe en el punto 1(2), para obtener un plásmido que posee secuencias nucleótidas que codifican VH y VL de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR que ha sido diseñado.

(5) Modificación de la secuencia aminoácida de la región V del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR

Es conocido que cuando un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR se produce simplemente injertando sólo CDR en VH y VL de un anticuerpo derivado de un animal no humano en FR en VH y VL de un anticuerpo humano, su actividad de unión antigénica es más baja que la del anticuerpo original derivado de un animal no humano [*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)]. Como causa, se considera que varios residuos aminoácidos, no sólo en CDR, sino también en FR, están relacionados directa o indirectamente con la actividad de unión antigénica en VH y VL del anticuerpo original derivado de un animal no humano, y que han cambiado a distintos residuos aminoácidos de diferentes FR en VH y VL de un anticuerpo humano. Para resolver el problema, en los anticuerpos humanos en los que se ha injertado CDR, entre las secuencias aminoácidas de FR en VH y VL de un anticuerpo humano, un residuo aminoácido que se relaciona directamente con la unión a un antígeno, o un residuo aminoácido que se relaciona indirectamente con la unión a un antígeno interaccionando con un residuo aminoácido en CDR, o manteniendo la estructura tridimensional de un anticuerpo, es identificado y modificado a un residuo aminoácido que se encuentra en el anticuerpo del animal no humano original, para aumentar de este modo la actividad de unión antigénica que ha disminuído [*BIO/TECHNOLOGY*, 9, 266 (1991)]. En la producción de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, lo más importante es cómo identificar de modo eficiente los residuos aminoácidos relacionados con la actividad de unión antigénica en FR, de forma que la estructura tridimensional de un anticuerpo, se construya y analice mediante cristalografía de rayos X [*J. Mol. Biol.* 112, 535 (1977)], modelización computarizada [*Protein Engineering*, 7, 1501 (1994)] o similar. Aunque la información de la estructura tridimensional de los anticuerpos ha sido útil en la producción de un anticuerpo humano en el que se insertó CDR, todavía no se ha establecido un procedimiento para producir un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR que sea aplicable a todos los anticuerpos. Por tanto, deben requerirse habitualmente varios intentos, por ejemplo, varios anticuerpos modificados de cada anticuerpo se preparan para examinar la relación entre cada uno de los anticuerpos modificados y su actividad de unión antigénica.

La modificación de la secuencia aminoácida seleccionada de FR en VH y VL de un anticuerpo humano, puede ser llevada a cabo mediante PCR, utilizando varios ADN sintéticos para la modificación. Con respecto al producto

amplificado obtenido mediante la PCR, la secuencia nucleótida se determina según el procedimiento que se describe en el apartado 1(2) anterior, para conformar si la modificación del objetivo que se ha llevado a cabo se confirma.

(6) *Construcción del vector para la expresión del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR*

Un vector para la expresión del anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR puede construirse clonando los ADNc que codifican VH y VL del anticuerpo humano en el que se insertó CDR, construido en el apartado 1(4) y 1(5) por encima de los ADN que codifican CH y CL del anticuerpo humano, en el vector para la expresión del anticuerpo humanizado, tal como se describe en el apartado 1(1). Por ejemplo, cuando los sitios de reconocimiento para enzimas apropiadas de restricción se introducen en el extremo 5' de los ADN sintéticos que se disponen en ambos extremos entre los ADN sintéticos utilizados en la construcción de VH y VL de un anticuerpo humano en el que se ha insertado CDR, en los apartados 1(4) y 1(5), puede llevarse a cabo la clonación de forma que se expresen de forma apropiada por encima de los ADN que codifican CH y CL del anticuerpo humano, en el vector de preexpresión del anticuerpo humanizado, tal como se describe en el apartado 1(1).

(7) *Expresión transitoria de los anticuerpos humanizados*

Para evaluar eficientemente la actividad de unión antigénica de varios anticuerpos humanizados producidos, los anticuerpos humanizados puede expresarse transitoriamente utilizando el vector de expresión del anticuerpo humanizado, tal como se describe en los apartados 1(3) y 1(6), o su vector modificado de expresión. Cualquier célula puede utilizarse como célula huésped, siempre que ésta pueda expresar un anticuerpo humanizado. Generalmente, las células COS-7 (ATCC CRL1651) se utilizan en vista de su alta expresión [*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC Press, p.283 (1991)]. El procedimiento para introducir el vector de expresión en las células COS-7 incluye un procedimiento DEAE-dextrano [*Methods in Nucleic Acids Res.*, CRC Press, p.283 (1991)], un procedimiento de lipofección [*Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 84, 7413 (1987)] y similares.

Después de la introducción del vector en la célula, la cuantía de la expresión y la actividad de unión antigénica del anticuerpo humanizado en el sobrenadante del cultivo, puede determinarse mediante inmunoensayo [ELISA, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)] y similares.

(8) *Expresión estable del anticuerpo humanizado*

Un transformante que produzca un anticuerpo humanizado de manera estable, puede obtenerse introduciendo en una célula huésped apropiada el vector de expresión del anticuerpo humanizado que se describe en los apartados 1(3) y 1(6).

El procedimiento para introducir el vector de expresión en una célula huésped incluye la electroporación [solicitud de patente japonesa publicada no examinada n°: 257891/90, *Cytotechnology*, 3, 133 (1990) y similares.

Cualquier célula puede utilizarse como célula huésped en la que el vector para la expresión del anticuerpo humanizado va a introducirse, siempre que pueda expresar un anticuerpo humanizado. Los ejemplos incluyen las células SP2/0-Ag14 del ratón (ATCC CRL1581), las células P3X63-Ag8.653 del ratón (ATCC CRL1580), células CHO en las que un gen de la dihidrofolato reductasa (*dhfr*) es defectuoso [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216 (1980)], las células YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20, células (YB2/0, ATCC CRL1662) y similares.

Después de la introducción del vector de expresión en la célula, los transformantes que expresan establemente un anticuerpo humanizado, se seleccionan cultivando en un medio para el cultivo de células animales, que comprende un agente tal como sulfato G418 (G418, preparado por Sigma) o similares [*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)]. El medio para el cultivo de células animales incluye medio PRMI1640 (preparado por Nissui Pharmaceutical), medio GIT (preparado por Nissui Pharmaceutical), medio EX-CELL302 (preparado por JRH), medio IMDM (preparado por GIBCO BRL), medio Hibridoma-SFM (preparado por GIBCO BRL), medios obtenidos añadiendo varios aditivos tales como FBS a estos medios, y similares. El anticuerpo humanizado puede obtenerse y acumularse en un medio de cultivo, cultivando los transformantes seleccionados en un medio. La cantidad y la actividad de unión antigénica del anticuerpo humanizado que se expresa en el medio de cultivo, puede cuantificarse mediante ELISA o similar. Asimismo, la cantidad producida del anticuerpo humanizado puede aumentar por transformantes que utilicen un sistema de amplificación *dhfr* o similar [*J. Immunol. Methods*, 167, 271 (1994)].

El anticuerpo humanizado puede purificarse a partir del medio cultivando el transformante, utilizando una columna proteína A [*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 8, (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)]. Pueden utilizarse cualesquiera otros procedimientos convencionales para la purificación proteica. Por ejemplo, el anticuerpo humanizado puede purificarse mediante combinación de filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración y similares. El peso molecular de la cadena H o de la cadena L del anticuerpo humanizado purificado o de la molécula de anticuerpo como un todo, se determina mediante electroforesis en gel de poliacrilamida [SDS-PAGE, *Nature*, 227, 680 (1970)], transferencia Western [*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 12, (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)] y similares.

2. Preparación del fragmento de anticuerpo

El fragmento del anticuerpo puede prepararse basándose en el anticuerpo humanizado que se describe en el apartado 1 genética o proteinoquímicamente. El fragmento de anticuerpo incluye Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, diacuerpo, dsFv, un CDR conteniendo un péptido y similares.

(1) Preparación de Fab

Fab puede prepararse tratando IgG con la enzima proteolítica papaína. Después del tratamiento con papaína, cuando el anticuerpo original es un subtipo IgG que posee una actividad de unión de la proteína A, puede recuperarse un Fab uniforme llevando a cabo un pase a través de una columna de proteína A para separar las moléculas IgG y los fragmentos Fc [*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición, (1995)]. Cuando el anticuerpo original es un anticuerpo del subtipo IgG que no tiene una actividad de unión de la proteína A, Fab puede recuperarse mediante cromatografía de intercambio iónico en una fracción eluida con una concentración salina baja [*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición, (1995)]. Además, Fab puede prepararse asimismo genéticamente utilizando *Escherichia coli*. Por ejemplo, puede prepararse un vector de expresión de Fab clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo que se describe en los apartados 1(2), 1(3) y 1(5) en un vector para la expresión de Fab. Como vector para la expresión de Fab, puede utilizarse cualquier vector, siempre que pueda insertarse y expresarse un ADN que codifique Fab. Los ejemplos incluyen pITI06 [*Science*, 240, 1041 (1988)] y similares. Fab puede formarse y acumularse en un cuerpo de inclusión o espacio periplásmico, introduciendo el vector de expresión de Fab en una *Escherichia coli* apropiada. El Fab que posee una actividad de unión puede obtenerse a partir del cuerpo de inclusión mediante un procedimiento de repliegue utilizado generalmente para producir una proteína, y cuando se expresa en el espacio periplásmico el Fab que posee una actividad de unión, puede escaparse al sobrenadante del cultivo. El Fab uniforme puede purificarse después del repliegue o a partir del medio de cultivo utilizando una columna unida al antígeno [*Antibody Engineering, A Practical Guide*, W.H. Freeman and Company (1992)].

(2) Preparación de F(ab')₂

F(ab')₂ puede prepararse tratando IgG con una pepsina proteásica. Después del tratamiento con pepsina, F(ab')₂ puede recuperarse mediante un procedimiento de purificación similar al caso de Fab [*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, tercera edición, Academic Press (1995)]. Además, puede prepararse asimismo mediante el procedimiento que se describe en el apartado 2(3) en el que Fab' se trata con maleimida tal como o-PDM o hexano de bismaleimida, para formar un enlace tioéter, o un procedimiento en el que se trata con DTNB para formar un enlace S-S [*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS, (1996)].

(3) Preparación de Fab'

Fab' puede prepararse tratando F(ab')₂ que se describe en el apartado 2(2), con un agente reductor tal como el ditiotreitól. Además, Fab' puede prepararse genéticamente utilizando *Escherichia coli*. Por ejemplo, un vector de expresión de Fab' puede construirse clonando el ADN que codifica la región V del anticuerpo que se describe en los apartados 1(2), 1(4) y 1(5) en un vector para la expresión de Fab'. Como vector para la expresión de Fab' puede utilizarse cualquier vector, siempre que un ADN que codifique Fab' pueda insertarse y expresarse. Ejemplos incluyen pAK19 [*Bio/Technology*, 10, 163 (1992)] y similares. Fab' puede formarse y acumularse en un cuerpo de inclusión o espacio periplásmico introduciendo el vector de expresión de Fab' en una *Escherichia coli* apropiada. El Fab' que tiene una actividad de unión puede obtenerse a partir del cuerpo de inclusión mediante un procedimiento para producir una proteína, y cuando se expresa en el espacio periplásmico, puede recuperarse extracelularmente para alterar las células con un tratamiento tal como la digestión parcial lisozímica, el golpe de presión osmótica o el tratamiento con ultrasonidos. El Fab' uniforme puede purificarse después de repliegue o a partir de la suspensión de células alteradas utilizando una columna de proteína G o similares [*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS, (1996)].

(4) Preparación de scFv

scFv puede prepararse genéticamente utilizando un fago o *Escherichia coli*. Por ejemplo, un ADN que codifica scFv se produce uniendo ADN que codifican el anticuerpo VH y VL que se describe en los apartados 1(2), 1(4) y 1(5) mediante un ADN que codifica un engarce polipeptídico que comprende una secuencia aminoácida de 12 residuos o más. Un vector de expresión de scFv puede construirse clonando el ADN en un vector para la expresión de scFv. Como vector para la expresión de scFv, puede utilizarse cualquier vector, siempre que el ADN que codifica scFv pueda insertarse y expresarse. Ejemplos incluyen pCANTAB5E (preparado por Pharmacia), Phfa [*Hum. Antibody Hybridoma*, 5, 48 (1994)] y similares. El vector de expresión de scFv se introdujo en una *Escherichia coli* apropiada y se infectó con un fago auxiliar para obtener así un fago que exprese scFv fusionado con la proteína superficial del fago en la superficie de éste. Asimismo, scFv puede formarse y acumularse en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico de *Escherichia coli* en el interior de la cual se introduce el vector de expresión de scFv. El scFv con una actividad de unión puede obtenerse a partir del cuerpo de inclusión mediante un procedimiento se utiliza generalmente para producir una proteína, y cuando se expresa en el espacio periplásmico, puede recuperarse extracelularmente alterando las células con un tratamiento tal como una digestión parcial lisozímica, golpe de presión osmótica, tratamiento con ultrasonidos o similares. El scFv uniforme puede purificarse después del repliegue o a partir de la suspensión de células alteradas mediante cromatografía de intercambio catiónico o similar [*Antibody Engineering, A Practical Approach*, IRL PRESS, (1996)].

(5) Preparación de diacuerpo

El diacuerpo puede prepararse cambiando el engarce polipeptídico utilizado para preparar el scFv anterior en alrededor de 3 a 10 residuos. Un fragmento dimérico de anticuerpo divalente puede prepararse cuando se utiliza VH y VL de una especie de anticuerpo. Un fragmento dimérico que tiene dos especificidades diferentes puede prepararse cuando se utilizan VH y VL de dos especies de anticuerpo [FEBS Letters, 453, 164 (1999), Int. J. Cancer, 77, 763 (1998)].

(6) Preparación de dsFv

dsFv puede prepararse genéticamente utilizando *Escherichia coli*. En primer lugar, los ADN en los que un residuo aminoácido codificado es reemplazado con un residuo de cisteína, son producidos introduciendo una mutación en posiciones apropiadas de los ADN que codifican el anticuerpo VH y VL que se describe en los apartados 1(2), 1(4) y 1(5). Los vectores de expresión para VH y VL pueden producirse clonando cada uno de los ADN en un vector para la expresión de dsFv. Como vector para la expresión de dsFv, puede utilizarse cualquier vector, siempre que pueda insertarse y expresarse un ADN que codifique dsFv. Ejemplos incluyen pULI9 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] y similares. Los vectores de expresión para VH y VL se introducen en una *Escherichia coli* apropiada para formar y acumular, de este modo, el VH y VL en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico. El VH y VL se obtienen a partir del cuerpo de inclusión o del espacio periplásmico y se mezclan, y, mediante un procedimiento de repliegue que se utiliza generalmente para producir una proteína, puede obtenerse dsFv con actividad de unión. Después del repliegue, puede purificarse posteriormente mediante cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o similares [Protein Engineering, 7, 697 (1994)].

(7) Preparación de CDR que comprende un péptido

Un CDR que comprende un péptido puede prepararse mediante un procedimiento de síntesis química tal como Fmoc o tBoc. Asimismo, se prepara un ADN que codifica un CDR que comprende un péptido, y el ADN resultante es clonado en un vector apropiado para la expresión, para preparar de este modo el CDR que comprende el péptido. Como vector para la expresión, puede utilizarse cualquier vector, siempre que pueda insertarse y expresarse un ADN que codifique un CDR que comprenda un péptido. Ejemplos incluyen pLEX (preparado por Invitrogen), pAX4a+ (preparado por Invitrogen) y similares. El vector de expresión se introduce en una *Escherichia coli* apropiada, de forma que el CDR que comprende el péptido pueda formarse y acumularse en el cuerpo de inclusión o en el espacio periplásmico. El CDR que comprende un péptido puede obtenerse a partir del cuerpo de inclusión o del espacio periplásmico, y puede purificarse mediante cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel o similares [Protein Engineering, 7, 697 (1994)].

3. Evaluación de la actividad del anticuerpo humanizado o del fragmento de anticuerpo

(1) Actividad de unión antigénica

La actividad de unión de FGF-8 del anticuerpo humanizado preparado o del fragmento del anticuerpo, puede medirse mediante ELISA o mediante resonancia plasmática superficial [J. Immunol Methods, 145, 229 (1991)] o similar.

(2) Actividad de inhibición para la función que posee FGF-8

La actividad inhibitoria para la función que tiene FGF-8 de un anticuerpo humanizado preparado o del fragmento del anticuerpo, puede medirse, por ejemplo, mediante un ensayo de crecimiento celular, utilizando una progenie celular. Por ejemplo, la actividad de inhibición para la función que tiene FGF-8 del anticuerpo humanizado preparado o del fragmento de anticuerpo, puede medirse cultivando la progenie celular cancerosa mamaria murina SC-3 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 8928 (1992)], la progenie celular fibroblástica murina NIH3T3 o una progenie celular de cáncer ovárico, cáncer mamario o cáncer prostático humano, como células diana, utilizando un medio que contiene de 1 a 100 ng/ml de PGF-8 o testosterona, durante 24 a 72 horas después de añadir el anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo al medio, diluido serialmente hasta una concentración final de 0,001 a 100 µg/ml, y midiendo entonces el número de células viables que utilizan una solución MTT [3-(bromuro de 4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio], un equipo de conteo celular, un equipo WST-1 o similar. Asimismo, la actividad del anticuerpo humanizado o del fragmento de anticuerpo o para inhibir la unión de FGF-8 al receptor superficial celular, puede medirse mediante el procedimiento de Bolton-Hunter en el que FGF-8 es marcada con ¹²⁵I [Biochem. J., 133, 527 (1973)] o de modo similar al de las progenies celulares mencionadas.

(3) Efecto antitumoral *in vivo*

El efecto antitumoral *in vivo* del anticuerpo humanizado preparado o del fragmento de anticuerpo, puede evaluarse, por ejemplo, utilizando el sistema de trasplante de células cancerosas de ratones desnudos que se muestra a continuación.

ES 2 303 859 T3

a. Evaluación del efecto antitumoral para el modelo de cáncer temprano

La progenie celular de cáncer mamario murino SC-3 se suspendió en PBS para dar lugar a una densidad de 1×10^7 células/ml y se trasplantó subcutáneamente a ratones desnudos machos de 6 a 8 semanas de edad a una dosis de 0,1 ml/animal (1×10^6 células/animal). Justamente después del trasplante, se administraron en la cavidad abdominal o en la vena caudal de los ratones, a una dosis de entre $10 \mu\text{g}$ y $400 \mu\text{g}$ /animal, el anticuerpo humanizado o el fragmento del anticuerpo. El anticuerpo se administró con una frecuencia de 1 a 7 veces en una semana, en un total de 1 a 10 veces. El efecto antitumoral puede evaluarse midiendo periódicamente los volúmenes tumorales entre 14 y 60 días después del trasplante tumoral, y comparando los volúmenes tumorales con los del grupo negativo de control al que se administraron anticuerpos o con los del grupo al que se administró disolvente. Asimismo, el volumen tumoral (V) se calculó basándose en la ecuación siguiente, midiendo su longitud (L), anchura (W) y altura (H), utilizando calibradores porta

$$V(\text{mm}^3) = (L) \times (W) \times (H) \times 0,5236$$

b. Evaluación del efecto antitumoral para el modelo de cáncer avanzado

SC-3 se suspendió en PBS para dar lugar a una densidad de 1×10^7 células/ml y se trasplantó subcutáneamente a ratones desnudos machos de 8 y 6 semanas de edad a una dosis de 0,1 ml/animal (1×10^6 células/animal). Cuando, partiendo de 100 mm^3 , el volumen tumoral alcanza aproximadamente 300 mm^3 (aproximadamente el día 14 después del trasplante tumoral), la administración del anticuerpo humanizado o del fragmento de anticuerpo en la cavidad abdominal o en la vena caudal de los ratones, empieza a una dosis de entre $10 \mu\text{g}$ y $400 \mu\text{g}$ /animal. El anticuerpo se administra con una frecuencia de 1 a 7 veces por semana en un total de 1 a 10 veces. El efecto antitumoral puede evaluarse de la misma forma que en el modelo temprano de cáncer de a.

4. Procedimiento para utilizar el anticuerpo humanizado o su fragmento de anticuerpo

Ya que el anticuerpo humanizado o su fragmento de anticuerpo de la presente invención, se une específicamente a FGF-8, que se considera un factor de crecimiento de células cancerosas humanas que muestran un crecimiento dependiente de las hormonas sexuales, y que inhibe la función de FGF-8, será útil para tratar y diagnosticar cánceres humanos tales como el cáncer prostático, cáncer mamario, cáncer ovárico y tumores de las gónadas. Asimismo, ya que la proporción de secuencias aminoácidas derivadas de los anticuerpos humanos de los anticuerpos humanizados o de su fragmento de anticuerpo es superior a la existente en los anticuerpos derivados de un animal no humano, se espera que el anticuerpo humanizado o su fragmento de anticuerpo muestren una actividad citotóxica intensa en el organismo humano, que no muestre inmunogenicidad, y que sus efectos duren un largo tiempo.

El anticuerpo humanizado o su fragmento de anticuerpo, de la presente invención, pueden administrarse en solitario, pero se prefiere generalmente proporcionarlo en forma de una formulación farmacéutica producida mezclándolo con, por lo menos, un transportador farmacéuticamente aceptable según un procedimiento bien conocido en el campo técnico farmacéutico.

Se prefiere seleccionar una vía de administración que es la más efectiva para llevar a cabo el tratamiento deseado tal como la administración oral o la parenteral, por ejemplo, la administración intraoral, administración traqueal, administración rectal, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intravenosa, y similares. La inyección intravenosa se prefiere en una formulación del anticuerpo o peptídica.

La forma de dosificación incluye pulverizadores, cápsulas, comprimidos, gránulos, jarabes, emulsiones, supositorios, inyecciones, pomadas, esparadrapos, y similares.

Las formulaciones apropiadas para la administración oral incluyen emulsiones, jarabes, cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos, y similares.

Las preparaciones líquidas tales como emulsiones y jarabes, pueden producirse utilizando aditivos, por ejemplo, agua, azúcares tales como sacarosa, sorbitol, fructosa; glicoles tales como polietilenglicol, propilenglicol; aceites tales como aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja; antisépticos tales como p-hidroxibenzoato, y sabores tales como sabor de fresa, sabor de menta.

Pueden producirse cápsulas, comprimidos, polvos, gránulos y similares utilizando aditivos, por ejemplo, rellenos tales como lactosa, glucosa, sacarosa, manitol; agentes desintegrantes tales como almidón, alginato sódico; lubricantes tales como estearato magnésico; talco; aglutinantes tales como alcohol polivinílico, hidroxipropilcelulosa, gelatina; surfactantes tales como ésteres de ácidos grasos; y plastificantes tales como glicerina.

Las formulaciones apropiadas para la administración parenteral, incluyen inyecciones, supositorios, pulverizadores y similares.

Las inyecciones pueden prepararse utilizando un transportador tal como una solución salina, una solución de glucosa, o sus mezclas.

Los supositorios pueden prepararse utilizando un transportador tal como manteca de cacao, grasa hidrogenada o ácido carboxílico.

Asimismo, los pulverizadores pueden prepararse a partir del anticuerpo mismo o utilizando un transportador o similar, que no estimule las membranas mucosas de las vías aéreas y oral de los pacientes y pueda facilitar la absorción del anticuerpo o de su fragmento dispersándolo como partículas minúsculas.

El transportador incluye lactosa, glicerina, y similares. Dependiendo de las propiedades del anticuerpo o de su fragmento, y del transportador que vaya a utilizarse, pueden producirse aerosoles, polvos secantes y similares. Los aditivos ejemplificados en las preparaciones orales, pueden añadirse asimismo a las preparaciones parenterales.

La dosis y la frecuencia de administración varían, dependiendo del efecto terapéutico que se desee, del procedimiento de administración, del período de tratamiento, edad, peso corporal y similares, pero la dosis está generalmente comprendida entre 0,01 mg/kg y 20 mg/kg por día por adulto.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334CH-H5.

La Figura 2 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334CH-L4.

La Figura 3 muestra las etapas de construcción del plásmido pKANTEX1334.

La Figura 4 muestra las actividades de neutralización del anticuerpo KM1334 anti-FGF-8 del ratón y de los anticuerpos quiméricos KM3034 y KM3334 anti-FGF-8 respecto al crecimiento dependiente de FGF-8 de las células SC-3 de la progenie celular cancerosa mamaria murina. La abscisa y la ordenada indican la concentración del anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y el crecimiento relativo (%) cuando, por la adición de sólo FGF-8, es definido como del 100%, respectivamente. "O", "□", "Δ" y "x", indican actividades de KM1334, KM3034, KM3334 y KM2760 como control negativo, respectivamente.

La Figura 5 muestra las etapas de construcción del plásmido KM1334HV0.

La Figura 6 muestra las etapas de construcción del plásmido pKANTEX 1334HV0LV0.

La Figura 7 muestra resultados de la medición ELISA de las actividades de unión al FGF-8 del anticuerpo quimérico KM3334 anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV0, HV0LV6 y HV6LV6 en los que se ha insertado CDR anti-FGF-8. La abscisa y la ordenada indican la concentración del anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y la actividad de unión (OD415), respectivamente. "O", "□", "Δ" y "x", indican actividades de KM3334, HV0LV0, HV0LV6 y HV6LV6, respectivamente.

La Figura 8 muestra resultados de la medición BIAcore 2000 de las actividades de unión al FGF-8 del anticuerpo quimérico KM3334 anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV0, HV0LV6 y HV6LV6 en los que se ha insertado CDR anti-FGF-8. La abscisa y la ordenada muestran tiempo (segundos) y señal de resonancia (RU), respectivamente.

La Figura 9 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334LV3-1.

La Figura 10 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334LV4-2.

La Figura 11 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334LV3-2.

La Figura 12 muestra resultados de la medición BIAcore 2000 de las actividades de unión al FGF-8 del anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV0/CHO, HV0LV2-1/CHO, HV0LV2-2/CHO, HV0LV3-1/CHO, HV0LV3-2/CHO, HV0LV4-1/CHO, HV0LV4-2/VHO y HV0LV6/CHO, en los que se ha insertado CDR anti-FGF-8. La abscisa y la ordenada muestran tiempo (segundos) y señal de resonancia (RU), respectivamente.

La Figura 13 muestra las actividades de neutralización del anticuerpo KM3034 quimérico anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV2-1/CHO, HV0LV3-1/CHO, HV0LV4-1/CHO y HV0LV6/CHO anti-FGF-8 en los que se ha insertado CDR, respecto al crecimiento dependiente de FGF-8 de las células SC-3 de la progenie celular cancerosa mamaria murina. La abscisa y la ordenada indican la concentración del anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y el crecimiento relativo (%) cuando, por la adición de sólo FGF-8, es definido como del 100%, respectivamente. "O", "□", "Δ", "◇", "●" y "x", indican actividades de KM3034, HV0LV2-1/CHO, HV0LV3-1/CHO, HV0LV4-1/CHO, HV0LV6/CHO y KM2760, como control negativo, respectivamente.

La Figura 14 muestra las etapas de construcción del plásmido pKM1334LV3-3.

La Figura 15 muestra resultados de la medición BIAcore 2000 de las actividades de unión al FGF-8 del anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV3-1/CHO, HV0LV3-3/CHO, HV0LV4-3/CHO y HV0LV6/CHO anti-FGF-8 en los que se ha insertado CDR. La abscisa y la ordenada muestran tiempo (segundos) y señal de resonancia (RU), respectivamente.

La Figura 16 muestra las actividades de neutralización del anticuerpo KM3034 quimérico anti-FGF-8 y de los anticuerpos HV0LV3-1/CHO, HV0LV3-3/CHO, HV0LV4-3/CHO y HV0LV6/CHO anti-FGF-8 en los que se ha insertado CDR, respecto al crecimiento dependiente de FGF-8 de las células SC-3 de la progenie celular cancerosa mamaria murina. La abscisa y la ordenada indican la concentración del anticuerpo ($\mu\text{g/ml}$) y el crecimiento relativo (%) cuando, por la adición de sólo FGF-8, es definido como del 100%, respectivamente. “O”, “ Δ ”, “ $\blacksquare$ ”, “ $\blacktriangle$ ”, “ $\bullet$ ” y “x”, indican actividades de KM3034, HV0LV3-1/CHO, HV0LV3-3/CHO, HV0LV4-3/CHO, HV0LV6/CHO y KM2760, como control negativo, respectivamente.

La presente invención se explica a continuación, basándose en los Ejemplos; sin embargo, el alcance de la presente invención no está limitado por ellos.

Mejor modo de poner en práctica la invención

Ejemplo 1

Preparación del anticuerpo quimérico anti-FGF-8

1. Aislamiento y análisis del ADNc que codifica la región V del anticuerpo murino anti-FGF-8

(1) Preparación de ARNm a partir de células de hibridoma que producen anticuerpos murinos anti-FGF-8

A partir de 1×10^7 células de un hibridoma KM1334 (FERM BP-5451) capaz de producir un anticuerpo murino contra FGF-8 (al que en adelante se hará referencia como un “anticuerpo murino anti-FGF-8”), se prepararon aproximadamente $8 \mu\text{g}$ de ARNm utilizando un kit de preparación de ARNm (Kit de Aislamiento Rápido de la Pista del ARNm (preparado por Invitrogen), según las instrucciones adjuntas del fabricante.

(2) Preparación de bibliotecas de ADNc de la cadena L y de la cadena H del anticuerpo murino anti-FGF-8

A partir de $5 \mu\text{g}$ de ARNm de KM1334 obtenido en el apartado 1(1) del Ejemplo 1, se sintetizó ADNc que tenía un adaptador *EcoRI-NorI* en ambos extremos, utilizando un Equipo de Síntesis de ADNc Ahorrador de Tiempo (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones del fabricante adjuntas a él. A continuación, se prepararon las bibliotecas de ADNc utilizando el Equipo de Clonación λ ZAPII (fabricado por Stratagene). En primer lugar, una cantidad total del ADNc se disolvió en $20 \mu\text{l}$ de agua estéril y se fraccionó entonces mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar alrededor de $0,1 \mu\text{g}$ para cada fragmento de ADNc de aproximadamente $1,5 \text{ kb}$, que corresponde a la cadena H del anticuerpo tipo IgG y un fragmento ADNc de aproximadamente $1,0 \text{ kb}$, que corresponde a la cadena L del tipo κ . A continuación, cada $0,1 \mu\text{g}$ del fragmento de ADNc de aproximadamente $1,5 \text{ kb}$, y $0,1 \mu\text{g}$ del fragmento de ADNc de aproximadamente $1,0 \text{ kb}$ se unió con $1 \mu\text{g}$ del vector λ ZAPII en el cual, los extremos se habían desfosforilado con Fosfatasa Alcalina de Intestino de Ternera, después de digestión con una enzima de restricción *EcoRI* según las instrucciones adjuntas del fabricante.

Utilizando Gigapack II Packaging Extracts Gold (fabricado por Stratagene) según las instrucciones adjuntas del fabricante, $4 \mu\text{l}$ de cada solución reactiva después de la unión, se empaquetaron en el fago λ , y una cantidad suya apropiada se infectó con *Escherichia coli* XL1-Blue [*Biotechniques*, 5, 376 (1987)], para obtener aproximadamente $8,1 \times 10^4$ y $5,5 \times 10^4$ clones fágicos como una biblioteca ADNc de la cadena H y una biblioteca ADNc de la cadena L de KM1334, respectivamente. A continuación, cada fago se fijó en una membrana de nailon según el procedimiento convencional [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)].

(3) Clonación del ADNc de cadena L y cadena H del anticuerpo murino anti-FGF-8

Utilizando los Sistemas de Detección y Marcado Directo ECL de los Ácidos Nucleicos (fabricado por Amersham Pharmacia Biotech), según las instrucciones adjuntas del fabricante, los clones de la biblioteca de ADNc de la cadena H y los clones de la biblioteca de ADNc de la cadena L de KM1334 en la membrana de nailon, preparados en el apartado 1(2) del Ejemplo 1, se detectaron utilizando ADNc de la región C del anticuerpo murino [la cadena H es un fragmento de ADN que contiene el C γ 1 ADNc murino [*J. Immunol.*, 146, 2010 (1991)] y la cadena L es un fragmento de ADN que contiene el ADNc C κ murino [*Cell*, 22, 197 (1980)], como una sonda, para obtener 10 clones fágicos para cada uno de los clones de la cadena L y de la cadena H que reaccionaron intensamente con la sonda. A continuación, según las instrucciones del fabricante del Equipo de Clonación λ ZAPII (fabricado por Stratagene), cada clon fágico se convirtió a plásmido mediante el procedimiento de excisión *in vivo*. La secuencia nucleótida de ADNc contenida en cada uno de los plásmidos obtenidos de este modo se determinó mediante el procedimiento dideoxi [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)], utilizando el Big Dye Terminator Kit ver. 2 (fabricado por Applied Biosystems). Como resultado, se obtuvieron un plásmido pKM1334H7-1 que contenía un ADNc funcional de cadena H de longitud total y un plásmido pKM1334L7-1 que contenía un ADNc funcional de cadena L de longitud total, en los que la secuencia ATG considerada como un codón de iniciación, se encuentra en el extremo 5' del ADNc.

(4) *Análisis de la secuencia aminoácida de la región V del anticuerpo murino anti-FGF-8*

En SEC ID n°: 1 se muestra una secuencia nucleótida de VH completa, contenida en el plásmido pKM1334H7-1, en SEC ID n°: 2 se muestra su secuencia aminoácida deducida completa, en SEC ID n°: 3 se muestra una secuencia nucleótida completa de VL contenida en el plásmido pKM1334L7-1, y su secuencia aminoácida deducida completa se muestra en SEC ID n°: 4. Basándose en la comparación con los datos secuenciales de anticuerpos murinos conocidos [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] y la comparación con los resultados del análisis de las secuencias aminoácidas N-terminales de la cadena H y de la cadena L del anticuerpo KM1334 murino purificado anti-FGF-8, llevada a cabo mediante la degradación de Edman automática utilizando un secuenciador proteico PPSQ-10 (fabricado por Shimadzu Corporation), se encontró que cada ADNc aislado de este modo es un ADNc de longitud completa que codifica el anticuerpo KM1334 murino anti-FGF-8 que contiene una secuencia señal secretora, y la secuencia aminoácida en las posiciones 1 a 19 de la cadena H que se muestra en SEC ID n°: 2 y la secuencia aminoácida en las posiciones 1 a 19 de la cadena L que se muestra en SEC ID n°: 4 son las secuencias de la señal secretora. Asimismo, las secuencias aminoácidas de VH y VL que excluyen la secuencia señal secretora se muestran en SEC ID n°: 40 y SEC ID n°: 41, respectivamente.

A continuación, se examinó lo novedoso de las secuencias aminoácidas de VH y VL del anticuerpo KM1334 murino anti-FGF-8. Utilizando el Empaquetamiento GCG (versión 9.1, fabricado por Genetics Computer Group), como un programa de análisis secuencial, se recuperó mediante el procedimiento BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] una base de datos de la secuencia aminoácida de proteínas conocidas [PIR-Protein (Release 56.0)]. Como resultado, no se encontraron secuencias completamente idénticas con respecto a ambas cadenas, la L y la H, de forma que se confirmó que las secuencias VH y VL del anticuerpo KM1334 murino anti-FGF-8 son secuencias aminoácidas nuevas.

Además, los CDR de VH y VL del anticuerpo KM1334 murino anti-FGF-8 se identificaron comparándolos con secuencias aminoácidas conocidas del anticuerpo. Las secuencias aminoácidas de CDR1, 2 y 3 de VH del anticuerpo KM1334 murino anti-FGF-8 se muestran en SEC ID n°s: 5, 6 y 7 respectivamente, y las secuencias aminoácidas de CDR1, 2 y 3 de VL, se muestran en SEC ID n°s: 8, 9 y 10 respectivamente,

2. *Expresión estable del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 utilizando células animales*(1) *Construcción de plásmidos que contienen ADNc VH del anticuerpo quimérico anti-FGF-8*

Utilizando como matriz 50 ng del plásmido pKM1334H7-1 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 1, fragmentos del ADN sintético que posee las secuencias nucleótidas que se muestran en SEC ID n°s: 11 y 12 (preparadas por GENSET), se añadieron como cebadores para dar lugar a una concentración final de 0,3 $\mu\text{mol/l}$, llevándose a cabo la PCR calentando en primer lugar 50 μl en el volumen total de la mezcla a 94°C durante 2 minutos y a continuación 30 ciclos de reacciones a 94°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto como un ciclo, según las instrucciones adjuntas del fabricante, a KOD más polimerasa (fabricado por TOYOBO). El producto de la reacción fue purificado, disuelto en agua estéril y entonces se le dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo). La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μg de un fragmento *EcoRI* de aproximadamente 0,48 kb (el lado del extremo 5' es *EcoRI*, el lado del extremo 3' es romo).

A continuación, 3 μg del plásmido pBluescript SK(-) se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparado por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRV* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 μg de un fragmento *EcoRI-EcoRV* de aproximadamente 2,95 kb.

A continuación, 0,1 μg del fragmento *EcoRI* de ADNc VH y 0,1 μg del fragmento *EcoRI-EcoRV* derivado del plásmido pBluescript SK(-) obtenidos ambos anteriormente, se añadieron a 10 μl en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, *E. coli* XL1-Blue se transformó para obtener un plásmido pKM1334CH-H5 que se muestra en la Figura 1, que contiene ADNc VH del anticuerpo quimérico anti-FGF-8.

(2) *Construcción del plásmido que contiene ADNc VL del anticuerpo quimérico anti-FGF-8*

Utilizando como matriz 50 ng del plásmido pKM1334L7-1 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 1, fragmentos del ADN sintético que posee las secuencias nucleótidas que se muestran en SEC ID n°: 13 y 14 (preparadas por GENSET), se añadieron como cebadores para dar lugar a una concentración final de 0,3 $\mu\text{mol/l}$, llevándose a cabo la PCR calentando en primer lugar 50 μl en el volumen total de la mezcla a 94°C durante 2 minutos y a continuación 30 ciclos de reacciones a 94°C durante 15 segundos, 57°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto como un ciclo, según las instrucciones adjuntas del fabricante, a KOD más polimerasa (fabricado por TOYOBO). El producto de la reacción fue purificado, disuelto en agua estéril y entonces se le dejó reaccionar a 37°C durante 1 hora utilizando 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo). La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μg de un fragmento *EcoRI* de aproximadamente 0,45 kb (el lado del extremo 5' es *EcoRI*, el lado del extremo 3' es romo).

A continuación, 0,1 μ g del fragmento *EcoRI* de ADNc VL y 0,1 μ g del fragmento *EcoRI-EcoRV* derivado del plásmido pBluescript SK(-) obtenidos ambos anteriormente, se añadieron a 10 μ l en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, *E. coli* XL1-Blue se transformó para obtener un plásmido pKM1334CH-L4 que se muestra en la Figura 2, que contiene ADNc VL del anticuerpo quimérico anti-FGF-8.

(3) Construcción del vector de expresión pKANTEX1334 del anticuerpo quimérico anti-FGF-8

Utilizando el vector de expresión pKANTEX93 del anticuerpo humanizado, que se describe en WO97/10354 y los plásmidos pKM1334CH-H5 y pKM1334CH-L4 obtenidos en los apartados 2(1) y 2(2) del Ejemplo 1, se construyó un vector de expresión pKANTEX1334 del anticuerpo quimérico anti-FGF-8, de la siguiente forma.

Se llevó a cabo una reacción mezclando 3 μ g del plásmido pKM1334CH-H5 obtenido en el apartado 2(1) del Ejemplo 1, con 10 unidades de la enzima de restricción *NotI* (preparada por New England Biolabs) y 10 unidades de la enzima de restricción *ApaI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar de aproximadamente 0,2 μ g de un fragmento *NotI-ApaI* de aproximadamente 0,48 kb.

A continuación, 3 μ g del vector de expresión pKANTEX93 del anticuerpo humanizado se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *ApaI* (preparado por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *NotI* (preparada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar de aproximadamente 2 μ g de un fragmento *ApaI-NotI* de aproximadamente 12,8 kb.

A continuación, 0,1 μ g del fragmento *NotI-ApaI* derivado del plásmido pKM1334CH-H5 y 0,1 μ g del fragmento *NotI-ApaI* derivado del plásmido pKANTEX93, se añadieron a 10 μ l en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, *E. coli* XL1-Blue se transformó para obtener el plásmido pKANTEX1334H que se muestra en la Figura 3.

A continuación, 3 μ g del plásmido pKM1334CH-L4 obtenido en el apartado 2(2) del Ejemplo 1, se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *BsiWI* (preparada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar de aproximadamente 0,2 μ g de un fragmento *EcoRI-BsiWI* de aproximadamente 0,45 kb.

A continuación, 3 μ g del plásmido pKANTEX1334H obtenido anteriormente, se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *BsiWI* (preparada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 μ g de un fragmento *EcoRI-BsiWI* de aproximadamente 13,30 kb.

A continuación, 0,1 μ g del fragmento *EcoRI-BsiWI* derivado del plásmido pKM1334CH-L4 y 0,1 μ g del fragmento *EcoRI-BsiWI* derivado del plásmido pKANTEX1334H, se añadieron a 10 μ l en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, *E. coli* XL1-Blue se transformó para obtener el plásmido pKANTEX1334 que se muestra en la Figura 3.

Utilizando 400 mg del plásmido así obtenido, el análisis de su secuencia nucleotídica se llevó a cabo mediante el procedimiento dideoxi [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab Press, New York (1989)], utilizando Big Dye Terminator Kit ver. 2 (preparado por Applied Biosystems), confirmando de este modo que se obtuvo un plásmido en el que el ADN de interés se había clonado.

(4) Expresión estable del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 utilizando las células CHO-DG44

Utilizando el vector de expresión pKANTEX1334 del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 obtenido en el apartado 2(3) del Ejemplo 1, la expresión del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 en las células CHO/DG44 [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 4216 (1980)] se llevó a cabo de la forma siguiente.

Después de que 10 μ g del plásmido pKANTEX1334 se introdujeran en $1,6 \times 10^6$ células CHO/DG44 mediante electroporación [*Citotechnology*, 3, 133 (1990)], las células se suspendieron en 10 a 30 ml de medio IMDM-1xHT, suplementado con dFBS (10) [medio IMDM que contenía 10% de suero bovino fetal dializado (dFBS) y suplemento de 1 x HT, (todos preparados por GIBCO)], y se administraron a razón de 100 μ l/pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos (fabricada por IWAKI). Después de cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador de CO₂ al 5%, el medio de cultivo se cambió a IMDM-dFBS(10), que se preparó eliminando sólo el suplemento HT, seguido por cultivo durante 1 a 2 semanas. Los sobrenadantes del cultivo se recuperaron a partir de los pocillos en los que colonias resistentes se desarrollaron y llegaron a la confluencia, y la actividad de unión antigénica de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 en los sobrenadantes se midió mediante el ELISA que se muestra en el apartado 2(6) del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes de los pocillos en los que la expresión de los anticuerpos quiméricos de anti-FGF-8 se encontró en los sobrenadantes del cultivo, para aumentar la cuantía de la expresión de los anticuerpos utilizando un sistema de amplificación del gen *dhfr*, se inocularon en una placa de 24 pocillos y se cultivaron durante 2 semanas en medio IMDM-dFBS (10) que contenía 50 nmoles/l de metotrexato (MTX; preparado por SIGMA), que es un inhibidor del producto génico *dhfr dihidrofolato reductasa*. La concentración de MTX aumentó posteriormente a 200 nmoles/l y entonces a 500 nmoles/l, seguido por cultivo durante 2 semanas en cada etapa de aumento, para inducir transformantes que mostraran resistencia a 500 nmoles/l de MTX. Cuando los transformantes mostraron confluencia en los pocillos, la actividad de unión antigénica de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 en los sobrenadantes, se midió mediante ELISA, que se muestra en el apartado 2(6) del Ejemplo 1. Finalmente, se obtuvieron transformantes que pueden desarrollarse en el medio IMDM-dFBS (10) que contenía 500 nmoles/l de MTX y que expresaban intensamente anticuerpos quiméricos anti-FGF-8. Con respecto a los transformantes obtenidos de esta manera, se llevó a cabo un aislamiento celular único (clonación) mediante el procedimiento de dilución limitante, y un clon de una célula transformada que mostraba la expresión más alta del anticuerpo quimérico anti-FGF-8, se denominó KM3034. Asimismo, KM3034 se ha depositado el 26 de diciembre de 2001, como FERM BP-7836 en el Organismo de Depósito Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

(5) *Expresión estable del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 utilizando las células YB2/0*

Utilizando el vector de expresión pKANTEX1334 del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 obtenido en el apartado 2 (3) del Ejemplo 1, la expresión del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 en las células YB2/0 (ATCC CRL1662) se llevó a cabo de la forma siguiente.

Después de que 10 μ g del plásmido pKANTEX1334 se introdujeran en 4 x 10⁶ células YB2/0 (ATCC CRL1662) mediante electroporación [*Citotechnology*, 3, 133 (1990)], las células se suspendieron en 40 ml de medio Hybridoma-SFM-FBS (5) [medio Hybridoma-SFM (preparado por Gibco) que contenía 5% de suero bovino fetal (FBS, fabricado por PAA Laboratories)] y que se administraron a razón de 200 μ l/pocillo en una placa de cultivo de 96 pocillos (fabricada por Sumitomo Bakelite). Después de cultivarlas a 37°C durante 24 horas en un incubador de CO₂ al 5%, se añadió G418 para dar lugar a una concentración de 1 mg/ml, seguido por cultivo durante 1 a 2 semanas. Los sobrenadantes del cultivo se recuperaron a partir de los pocillos en los que colonias de transformantes que mostraban resistencia a G418 se desarrollaban, confirmando su propagación, midiendo la actividad de unión antigénica de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 en los sobrenadantes mediante el ELISA que se muestra en el apartado 2(6) del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes de los pocillos en los que la expresión de los anticuerpos quiméricos de anti-FGF-8 se encontró en los sobrenadantes del cultivo, para aumentar la cuantía de la expresión de los anticuerpos utilizando un sistema de amplificación del gen *dhfr*, se suspendieron en el medio de Hybridoma-SFM-FBS (5) que contenía 1 mg/ml de G418 y 50 nmoles/l de MTX (preparado por SIGMA), para dar lugar a una densidad de 1 a 2x10⁵ células/ml, y que se administraron a razón de 1 ml en una placa de 24 pocillos (fabricada por Greiner). Cultivando a 37°C durante 1 a 2 semanas en un incubador de CO₂ al 5%, se indujeron transformantes que mostraban resistencia a MTX de 50 nmoles/l. La actividad de unión antigénica de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 en los sobrenadantes del cultivo en los pocillos en los que la proliferación de los transformantes se observó, se midió mediante el ELISA que se muestra en el apartado 2(6) del Ejemplo 1.

Con respecto a los transformantes de los pocillos en los que la expresión de los anticuerpos quiméricos de anti-FGF-8 se encontró en los sobrenadantes del cultivo, las concentraciones de MTX aumentaron mediante el mismo procedimiento que el descrito anteriormente, encontrándose un transformante 5-D capaz de crecer en el medio Hybridoma-SFM-FBS(5) que contenía 1 mg/ml de G418 y 200 nmoles/l de MTX en las concentraciones finales, y de desarrollar una alta expresión del anticuerpo quimérico anti-FGF-8. Con respecto al transformante obtenido de esta forma, se llevó a cabo una clonación mediante un procedimiento de dilución limitante para obtener una progenie celular transformada que muestra la expresión más intensa del anticuerpo quimérico anti-FGF-8. La progenie celular transformada obtenido de esta forma, se denominó KM3334.

(6) *Actividad de unión del anticuerpo al péptido FGF-8 (ELISA)*

El compuesto 1 (SEC ID n°: 15) se seleccionó como el péptido humano FGF-8 con el cual puede reaccionar el anticuerpo anti-FGF-8. Para utilizar la medida de la actividad mediante ELISA, se preparó y utilizó como antígeno su conjugado con la albúmina sérica bovina (BSA, preparado por Nacalai Tesque). Es decir, 100 μ l de una solución de 25 mg/ml de SMCC de éster N-hidroxisuccinimida del ácido [4-N-maleimidometil]clohexano-1-carboxílico (preparado por Sigma)-DMSO, se añadió gota a gota bajo agitación a 900 μ l de solución PBS que contenía 10 mg de BSA, seguido por agitación lenta durante 30 minutos. Después de que se aplicara 1 ml de la solución reactiva a una columna de filtración en gel como columna NAP-10 que se había equilibrado con 25 ml de PBS, se utilizó como solución BSA-SMCC el eluido eluido con 1,5 ml de PBS. La concentración de BSA de cada fracción se midió basándose en la absorbancia a 280 nm. A continuación, 200 μ l de DMSO se añadieron a 1,0 mg del Compuesto 1, que se disolvió entonces completamente añadiendo 800 μ l de PBS, añadiéndose bajo agitación la solución BSA-SMCC anterior (2,5 mg de BSA), seguido por agitación lenta a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución reactiva se dializó durante la noche a 4°C contra PBS, añadiéndose a ella azida sódica, para dar lugar a una concentración del 0,05%, filtrándose la mezcla mediante un filtro de 0,22 μ m, y utilizando el filtrado como una solución BSA-compuesto 1.

El conjugado preparado anteriormente se administró a razón de 50 μ l/pocillo a una placa de 96 pocillos para ELISA (preparado por Greiner), a una concentración de 0,5 a 1,0 μ g/ml, dejándose reposar por la noche a 4°C. Después de lavar con PBS, PBS que contenía BSA al 1% (BSA-PBS) se añadió a razón de 100 μ l/pocillo, dejando que se bloquearan los grupos activos restantes para reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavar cada pocillo con PBS que contenía Tween al 0,05% (Tween-PBS), los sobrenadantes del cultivo de los transformantes o los anticuerpos purificados, se añadieron a razón de 50 μ l/pocillo, dejándoles reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción, cada pocillo se lavó con Tween-PBS, añadiéndose entonces una solución de anticuerpo de cabra anti-IgG (H & L) humana marcada con peroxidasa (preparada por American Qualex) diluida de 3000 a 6000 veces con BSA-PBS, como una solución de anticuerpo secundario, a razón de 50 μ l/pocillo, dejándose reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de la reacción y lavado subsiguiente con Tween-PBS, una solución de sustrato ABTS [solución preparada disolviendo 0,55 g de 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)amonio en 1 l de tampón 0,1 M citrato (pH 4,2) y añadiendo 1 μ l/ml de peróxido de hidrógeno justamente antes de usarlo] se añadió a razón de 50 μ l/pocillo para que se apareciera color, deteniéndose la reacción añadiendo una solución de SDS al 5% a razón de 50 μ l/pocillo. Entonces, se midió la absorbancia a 415 nm (OD415).

3. Purificación del anticuerpo quimérico anti-FGF-8

(1) Cultivo de las células de expresión derivadas de las células CHO-DG44 y purificación del anticuerpo

La progenie celular KM3034 transformada que expresa el anticuerpo quimérico anti-FGF-8, obtenida en el apartado 2(4) del Ejemplo 1, se suspendió en el medio IMDM-dFBS (10) que contenía 500 nmoles/l de MTX, para dar lugar a una densidad de 1 a 2×10^5 células/ml, administrándose a razón de 40 ml a un matraz de 175 cm² (fabricado por Greiner). Cuando las células adquirieron confluencia, cultivando a 37°C durante 5 a 7 días en un incubador de CO₂ al 5%, el sobrenadante del cultivo se desechó y las células se lavaron con 20 ml de PBS. Después de desechar el PBS y añadir a continuación 40 ml de medio EXCELL301 (preparado por JRH), las células se cultivaron a 37°C durante 7 a 14 días en un incubador de CO₂ al 5%, recuperándose entonces el sobrenadante del cultivo. Utilizando una columna Prosep-A (fabricada por Millipore) y según las instrucciones del fabricante a ella adjuntas, el anticuerpo quimérico anti-FGF-8 se purificó a partir del sobrenadante del cultivo. El anticuerpo quimérico anti-FGF-8 así obtenido se denominó KM3034.

(2) Cultivo de las células de expresión derivadas de las células YB2/0 y purificación del anticuerpo

La progenie celular transformada KM3334 que expresa el anticuerpo quimérico anti-FGF-8 obtenida en el apartado 2(5) del Ejemplo 1, se cultivó en medio Hybridoma-SFM (preparado por Gibco) que contenía 200 nmoles/l de MTX y 5% en concentración de GF21 de Daigo (preparado por Wako Pure Chemical Industries) a 37°C en un incubador de CO₂ al 5%, utilizando un matraz de 175 m² (fabricado por Greiner). Utilizando una columna de Prosep-A (fabricada por Millipore) y según las instrucciones del fabricante adjuntas a ella, el anticuerpo quimérico anti-FGF-8 se purificó a partir del sobrenadante del cultivo que se había recuperado después de 8 a 10 días del cultivo. El anticuerpo quimérico anti-FGF-8 así obtenido se denominó KM3334.

4. Análisis del anticuerpo quimérico anti-FGF-8 purificado

Aproximadamente 4 μ g de cada uno de los dos anticuerpos quiméricos KM3034 y KM3334 anti-FGF-8 que se expresan en las células animales respectivas, que se purificaron y obtuvieron en el apartado 3 del Ejemplo 1, se sometieron a SDS-PAGE según el procedimiento conocido [*Nature*, 227, 680 (1970)] para analizar sus pesos moleculares y pureza. En cada uno de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 purificados, se encontraron bajo condiciones no reductoras, una banda única de aproximadamente 150 Kd de peso molecular, y dos bandas de aproximadamente 50 Kd y de aproximadamente 25 Kd. Estos pesos moleculares coincidieron casi con los pesos moleculares deducidos a partir de las secuencias nucleótidas de ADNc de las cadenas H y L del anticuerpo (cadena H, alrededor de 49 Kd, cadena L, aproximadamente 23 Kd, molécula entera, de aproximadamente 144 Kd), y coincidían también con los informes que establecían que el anticuerpo de tipo IgG posee un peso molecular de aproximadamente 150 Kd bajo condiciones no reductoras y que se degrada en cadenas H que tienen un peso molecular de aproximadamente 50 Kd y cadenas L que tienen un peso molecular de aproximadamente 25 Kd bajo condiciones reductoras debido a la fragmentación del enlace S-S en la molécula [*Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, capítulo 14, (1988); *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press Limited (1996)], por lo que se confirmó que cada uno de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 se expresó y purificó como una molécula de anticuerpo de una estructura correcta.

5. Evaluación de la actividad de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 purificados

La actividad neutralizante de FGF-8 de los anticuerpos quiméricos anti-FGF-8 purificados, se evaluó midiendo el efecto inhibitorio del desarrollo dependiente de FGF-8 de una progenie celular SC-3 de cáncer mamario murino [*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 8928 (1992)]. Es decir, las células SC-3 se suspendieron en una densidad de $3,0 \times 10^4$ células/ml en un medio F12 de Ham:DMEM (1:1) (fabricado por Gibco) que contiene FBS activado tratado con carbono al 2% y se inocularon a 150 μ l ($4,5 \times 10^3$ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos. Después de cultivar a 37°C durante 18 horas en un incubador de CO₂ al 5%, el medio se intercambió utilizando 100 μ l/pocillo de un medio de ensayo. El medio de ensayo se preparó disolviendo 50 ng/ml de FGF-8 (preparado por R&D) y anticuerpo quimérico anti-FGF-8 en cada concentración diluida en medio F12 de Ham:DMEM (1:1) conteniendo BSA al 0,1%.

Asimismo, el anticuerpo quimérico KM2760 para el receptor CCR4 humano de la quemoquina que se describe en WO01/64754 se utilizó como un anticuerpo de control negativo. Después de cultivar a 37°C durante 48 horas en un incubador de CO₂ al 5%, el medio se intercambiaba con un medio de ensayo recién preparado, seguido por cultivo durante 48 horas. El reactivo WST-1 (preparado por Roche) se añadió a razón de 10 µl/pocillo, seguido por una ligera agitación, midiéndose entonces OD_{430/650} después de cultivar a 37°C durante 1 hora en el incubador de CO₂ al 5%. En la Figura 4, la abscisa y la ordenada muestran la concentración del anticuerpo añadido y el desarrollo relativo (%) respecto al desarrollo, después de añadir sólo 50 ng/ml de FGF-8, respectivamente. El desarrollo relativo (%) respecto al desarrollo, después de añadir sólo 50 ng/ml de FGF-8, se calculó mediante la siguiente ecuación:

(Ecuación)

$$\text{Desarrollo relativo (\%)} \text{ respecto al desarrollo, después de la adición de FGF-8} = \frac{[(\text{valor OD después de la adición de FGF-8 y del anticuerpo}) - (\text{valor OD antes de la adición de FGF-8 y del anticuerpo})] / [(\text{valor OD después de añadir sólo el FGF-8}) - (\text{valor OD antes de la adición de FGF-8 y del anticuerpo})]}{100}$$

Tal como se muestra en la Figura 4, cada uno de los anticuerpos murinos KM1334 anti-FGF-8 y los anticuerpos quiméricos KM3034 y KM3334 anti-FGF-8 mostraron una similar actividad inhibitoria del desarrollo de las células SC-3, de modo que, mediante la formación de los anticuerpos quiméricos, no se encontró reducción de la actividad.

Ejemplo 2

Preparación del anticuerpo humano en el que se inserta CDR, para FGF-8

1. Construcción del ADNc que codifica VH y VL del anticuerpo humano en el que se inserta CDR, contra FGF-8

(1) Diseño de las secuencias aminoácidas de VH y VL del anticuerpo humano en el que se inserta CDR, para FFGF-8

En primer lugar, la secuencia aminoácida de VH de un anticuerpo humano en el que se inserta CDR, contra FGF-8 (anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8) se diseñó de la siguiente manera. Para injertar la secuencia aminoácida de CDR en VH del anticuerpo murino KM1334, anti-FGF-8, que se identifica en el apartado 1(4) del Ejemplo 1, se seleccionó la secuencia aminoácida de FR en VH de un anticuerpo humano. Kabat *et al* han clasificado VH de diversos anticuerpos humanos conocidos en tres subgrupos (HSG I a III) basándose en la homología de las secuencias aminoácidas, informando entonces de secuencias consensuadas entre los subgrupos respectivos [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and Human Services (1991)]. Ya que estas secuencias consensuadas tienen una posibilidad de que la inmunogenicidad se reduzca en el hombre, se decidió diseñar la secuencia aminoácida de VH de un anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, basándose en estas secuencias consensuadas. Para preparar un anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, que tenga una actividad mayor al diseñarlo, se decidió seleccionar la secuencia aminoácida de FR que tuviera la homología más alta con la secuencia aminoácida de FR en VH de KM1334, entre las secuencias aminoácidas de FR en secuencias consensuadas de los tres subgrupos de VH de los anti-cuerpos humanos. Los resultados de la búsqueda de homologías se muestran en la Tabla 1. Como se muestra en la Tabla 1, la secuencia aminoácida de FR en la región VH de KM1334 mostró la homología más alta con el subgrupo I.

TABLA 1

Homología entre la secuencia aminoácida de FR en secuencias de consenso de cada subgrupo de VH del anticuerpo humano y la secuencia aminoácida de FR en VH de KM1334

HSG I	HSG II	HSG III
79,3%	51,7%	59,8%

Basándose en los resultados anteriores, una secuencia aminoácida HV.0 de VH del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, que se describe en SEC ID n°: 16, se diseñó insertando la secuencia aminoácida de CDR en VH del anticuerpo murino KM1334 en una posición apropiada de la secuencia aminoácida de FR en la secuencia de consenso del subgrupo I de VH del anticuerpo humano.

A continuación, la secuencia aminoácida de VL de un anticuerpo en el que se inserta CDR, anti FGF-8, se diseñó de la manera siguiente. Para injertar la secuencia aminoácida de CDR en VL del anticuerpo murino KM1334, anti FGF-8, que se identifica en el apartado 1(4) del Ejemplo 1, se seleccionó la secuencia aminoácida de FR en VL de un anticuerpo humano. Kabat *et al* han clasificado la VL de diversos anticuerpos humanos conocidos en cuatro subgrupos (HSG I a IV) basándose en la homología de las secuencias aminoácidas, informando entonces de secuencias consensuadas entre los subgrupos respectivos [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dep. Health and

ES 2 303 859 T3

Human Services (1991)]. De acuerdo con esto, y de modo similar al caso de VH, la secuencia aminoácida de FR que tenga la homología más alta con la secuencia aminoácida de FR en VL de KM1334, se seleccionó a partir de las secuencias aminoácidas de FR en secuencias consensuadas de los cuatro subgrupos de VL de los anticuerpos humanos.

Los resultados de la búsqueda de homologías se muestran en la Tabla 2. Como se muestra en la Tabla 2, la secuencia aminoácida de FR en la región VL de KM1334 mostró la homología más alta con el subgrupo II.

TABLA 2

Homología entre la secuencia aminoácida de FR en secuencias de consenso de cada subgrupo de VL del anticuerpo humano y la secuencia aminoácida de FR en VL de KM1334

HSG I	HSG II	HSG III	HSG IV
66,3%	83,8%	66,2%	73,8%

Basándose en los resultados anteriores, la secuencia aminoácida LV.0 de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, que se describe en SEC ID n°: 17, se diseñó insertando la secuencia aminoácida de CDR en VL del anticuerpo murino KM1334, anti-FGF-8, en una posición apropiada de la secuencia aminoácida de FR en la secuencia de consenso del subgrupo II de VL del anticuerpo humano.

La secuencia aminoácida diseñada de este modo, HV.0 de VH y la secuencia aminoácida LV.0 de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, son secuencias en las que sólo la secuencia aminoácida CDR del anticuerpo murino KM1334 anti-FGF-8 se inserta en la secuencia aminoácida de FR en el anticuerpo humano seleccionado. En muchos casos, en el caso de los anticuerpos humanos en los que se inserta CDR, la actividad de unión disminuye injertando sólo la secuencia aminoácida CDR en el anticuerpo murino. Para evitar esta reducción, entre los residuos aminoácidos en distintos FR entre un anticuerpo humano y un anticuerpo murino, los residuos aminoácidos que se considera tienen influencias en la actividad de unión, se injertan conjuntamente con la secuencia aminoácida CDR. De acuerdo con esto, se llevó a cabo asimismo un intento en este Ejemplo, para identificar los residuos aminoácidos en FR que se consideran tienen influencias sobre la actividad de unión.

En primer lugar, una estructura tridimensional de una región V del anticuerpo que comprende la secuencia aminoácida HV.0 de VH, y la secuencia aminoácida LV.0 de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti FGF-8, diseñada en el (HV0LV0) anterior, se construyó utilizando técnicas de modelización informática. La preparación de los coordenados de la estructura tridimensional, se llevó a cabo utilizando software AbM (fabricado por Oxford Molecular), y la exhibición de la estructura tridimensional se realizó utilizando software Pro-Explore (fabricado por Oxford Molecular) o RasMol (fabricado por Glaxo), según las respectivas instrucciones de los fabricantes, adjuntas al equipo. Asimismo, se construyó de igual forma un modelo informático de la estructura tridimensional de la región V del anticuerpo murino KM1334 anti-FGF-8. Además, se construyó un modelo de estructura tridimensional de un anticuerpo modificado, que comprende una secuencia aminoácida en la que residuos aminoácidos distintos de un anticuerpo murino KM1334, anti-FGF-8, en las secuencias aminoácidas de FR en VH y VL de HV0LV0, se sustituyeron por los residuos aminoácidos de posiciones que correspondían al anticuerpo murino KM1334, anti-FGF-8, comparándose las estructuras tridimensionales de las regiones V del anticuerpo murino KM1334, anti-FGF-8, de HV0LV0, y de la estructura modificada. Como resultado, como residuos entre los residuos aminoácidos de FR en HV0LV0 que se consideró tenían influencias en la actividad del anticuerpo, mediante cambio en la estructura tridimensional de la región de unión antigénica, Lys en posición 12, Lys en posición 13, Ala en posición 40, Pro en posición 41, Met en posición 48, Val en posición 68, Ile en posición 70, Thr en posición 74, Thr en posición 76, Glu en posición 82, Arg en posición 87 y Tyr en posición 95, se seleccionaron para HV.0, e Ile en posición 2, Val en posición 3, Thr en posición 14, Pro en posición 15, Gln en posición 50, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, se seleccionaron para LV.0, y se utilizaron para la modificación de los aminoácidos. Cambiando por lo menos uno o más de estos residuos aminoácidos seleccionados, a los residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334, se diseñaron varias modificaciones de VH y VL de los anticuerpos humanos en los que se inserta CDR, de la manera siguiente.

Específicamente, la secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 18, en la que 6 residuos de Lys en posición 12, Lys en posición 13, Ala en posición 40, Pro en posición 41, Met en posición 48, y Tyr en posición 95, cambiaron a Ala, Arg, Arg, Ser, Ile y Phe, respectivamente, que se encontraron en el anticuerpo KM1334 murino, se diseñó como el VH. La secuencia aminoácida que se muestra en SEC ID n°: 19, en la que 6 residuos de Ile en posición 2, Thr en posición 14, Pro en posición 15, Gln en posición 50, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, cambiaron a Val, Ser, Leu, Lys, Val y Phe, respectivamente, que se encontraron en el anticuerpo murino KM1334, se diseñó como VL.

(2) Construcción de ADNc que codifica VH del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8

Se construyó, utilizando el procedimiento PCR, y de la manera siguiente, un ADNc que codifica la secuencia aminoácida HV.0 de VH del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, diseñada en el punto 1(1) del Ejemplo 2.

En primer lugar, la secuencia aminoácida diseñada se consiguió en una secuencia aminoácida completa uniendo la secuencia señal secretora de la cadena H del anticuerpo murino KM1334 anti-FGF-8 que se muestra en SEC ID n°: 2. A continuación, la secuencia aminoácida se convirtió en codones genéticos. Cuando se encontraron dos o más codones genéticos por un residuo aminoácido, el codon genético correspondiente se determinó considerando la utilización del codon que se había encontrado en las secuencias nucleótidas de los genes del anticuerpo [*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, US Dept. Health and Human Services (1991)]. Se diseñó una secuencia nucleótida de ADNc que codifica la secuencia aminoácida completa de la región V del anticuerpo, uniendo los codones genéticos determinados de este modo, y las secuencias nucleótidas complementarias de los cebadores que se iban a utilizar en la amplificación PCR (incluyendo las secuencias de reconocimiento enzimático de restricción, para clonar en un vector de expresión el anticuerpo humanizado), se añadieron a los extremos 5' y 3'. La secuencia nucleótida diseñada de este modo se dividió en secuencias, teniendo cada una 141 bases, desde el lado del extremo 5', y añadiendo secuencias nucleótidas diseñadas de tal forma que los extremos presentan una secuencia solapada de aproximadamente 20 bases, sintetizándose alternadamente en secuencia con sentido y secuencia antisentido. Específicamente, se sintetizaron 4 oligonucleótidos sintéticos de SEC ID n°: 20 a 23 (preparados por GENSET).

Cada oligonucleótido se añadió a 50 μ l de una solución reactiva, para dar lugar a una concentración final de 0,1 μ mol/l, llevándose a cabo PCR utilizando 0,5 μ mol/l M13 del cebador RV (preparado por Takara Shuzo), 0,5 μ mol/l M13 del cebador M4 (preparado por Takara Shuzo) y 2,5 unidades de la KOD polimerasa (preparada por TOYOBO) según las instrucciones del fabricante, adjuntas a la KOD polimerasa. Respecto a las condiciones reactivas, la solución de la reacción se preparó calentando a 94°C durante 5 minutos, siguiendo 25 ciclos de las reacciones a 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 74°C durante 60 segundos como un ciclo, y calentando posteriormente a 74°C durante 5 minutos. La solución reactiva se precipitó con etanol, y el precipitado se disolvió en agua estéril y la reacción se llevó a cabo utilizando 10 unidades de una enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *SpeI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μ g de un fragmento *EcoRI-SpeI* de aproximadamente 0,47 kb.

A continuación, 3 μ g de un plásmido pBluescript II SK(-) (preparado por Stratagene) se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades del enzima de restricción *SpeI* (fabricado por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa, para recuperar aproximadamente 2,9 μ g de un fragmento *EcoRI-SpeI* de aproximadamente 2,95 kb.

A continuación 0,1 μ g del fragmento *EcoRI-SpeI* del producto PCR de VH del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8 y 0,1 μ g del fragmento *EcoRI-SpeI* del plásmido pBluescript II SK(-), obtenidos ambos anteriormente, se añadieron a 10 μ l en volumen total de agua estéril, y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). *E. coli* DH5 α (preparado por TOYOBO) se transformó utilizando la solución obtenida de ADN plasmídico recombinante, preparando cada ADN plasmídico a partir de 10 clones de los transformantes, llevándose a cabo entonces el análisis de la secuencia nucleótida mediante el procedimiento dideoxi [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)], utilizando Big Dye Terminator Kit, ver. 2 (preparado por Applied Biosystems). Como resultado del análisis de la secuencia nucleótida, se obtuvo un plásmido pKM1334HV0 que se muestra en la Figura 5, que muestra la secuencia nucleótida de interés.

Asimismo, un ADNc que codifica la secuencia aminoácida HV.6 de VH del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8 diseñado en el apartado 1(1) del Ejemplo 2, se construyó mediante PCR de la misma manera que se describió anteriormente, utilizando, como ADN sintéticos, 4 oligonucleótidos sintéticos de SEC ID n°s 24 a 27 (preparados por GENSET). Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM1334HV6 que contenía ADNc que codifica HV.6.

(3) Concentración del ADNc que codifica VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8

Un ADNc que codifica la secuencia aminoácida LV.0 de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, diseñado en el apartado 1(1) del Ejemplo 2, se construyó mediante PCR de la misma forma que en el caso de VH. En este caso, sin embargo, la secuencia de la cadena L del anticuerpo murino KM1334 anti-FGF-8 que se muestra en SEC ID n°: 4, se utilizó como la secuencia señal secretora, y los 4 oligonucleótidos sintéticos de SEC ID n°s 28 a 31 (preparados por GENSET), se utilizaron como ADN sintéticos. Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM1334LV0 que contenía ADNc que codifica LV.0.

Asimismo, un ADNc que codifica la secuencia aminoácida LV.6 de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, diseñado en el apartado 1(1) del Ejemplo 2, se construyó mediante PCR de la misma forma en que se ha descrito anteriormente, utilizando 4 oligonucleótidos sintéticos de SEC ID n° 32 a 35 (preparados por GENSET) como ADN. Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM1334LV6 que contenía ADNc que codifica LV.6.

2. Construcción del vector de expresión del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8

Utilizando el pKANTEX93 para la expresión del anticuerpo humanizado que se describe en WO97/10354 y los plásmidos pKM1334HV0 y pKM1334LV4 obtenidos en los apartados 1(2) y 1(3) del Ejemplo 2, se construyó un vector de expresión pKANTEX 1334HV0LV0 del anticuerpo en el que se inserta CDR anti-FGF-8, de la manera siguiente.

ES 2 303 859 T3

Se llevó a cabo una reacción mezclando 3 μg del plásmido pKM1334HV0 obtenido en el apartado 1(2) del Ejemplo 2, con 10 unidades de la enzima de restricción *ApaI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *NotI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μg de un fragmento *ApaI-NotI* de aproximadamente 0,47 kb.

A continuación, 3 μg del vector de expresión pKANTEX93 del anticuerpo humanizado se dejó reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *ApaI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *NotI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 μg de un fragmento *ApaI-NotI* de aproximadamente 12,8 kb.

A continuación, 0,1 μg del fragmento *NotI-ApaI* derivado del plásmido pKM1334HV0 y 0,1 μg del fragmento *NotI-ApaI* derivado del plásmido pKANTEX93 se añadieron a 10 μl en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, *E. coli* DH5 α se transformó para obtener un plásmido pKANTEX1334HV0 que se muestra en la Figura 6.

A continuación, 3 μg del plásmido pKM1334LV0 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, se hicieron reaccionar 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *BsiWI* (preparada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μg de un fragmento *EcoRI-BsiWI* de aproximadamente 0,45 kb.

A continuación, 3 μg del plásmido pKANTEX1334HV0 obtenido anteriormente, se hizo reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *EcoRI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de la enzima de restricción *BsiWI* (preparada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 μg de un fragmento *EcoRI-BsiWI* de aproximadamente 13,30 kb.

A continuación, 0,1 μg del fragmento *EcoRI-BsiWI* derivado del plásmido pKM1334LV0 y 0,1 μg del fragmento *EcoRI-BsiWI* derivado del plásmido pKANTEX1334HV0 se añadieron a 10 μl en volumen total de agua estéril y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). Utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante así obtenida, la cepa de *E. coli* DH5 α se transformó para obtener un plásmido pKANTEX1334HV0LV0 que se muestra en la Figura 6.

Utilizando 400 mg del plásmido así obtenido, su secuencia nucleótida se analizó mediante el procedimiento dideoxi [*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Lab. Press, New York (1989)], utilizando Big Dye Terminator Kit ver. 2 (preparado por Applied Biosystems), para confirmar de este modo que se obtuvo un plásmido en el que el ADN de interés se había clonado.

Asimismo, se construyó un vector de expresión pKANTEX1334HV0LV6 de la misma manera que se describió anteriormente, utilizando el plásmido pKM1334HVO obtenido en el apartado 1(2) del Ejemplo 2 y el plásmido pKANTEX1334LV6 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2.

Además, se construyó un vector de expresión pKANTEX1334HV6LV6 mediante el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, utilizando el plásmido pKM1334HV6 obtenido en el apartado 1(2) del Ejemplo 2 y el plásmido pKANTEX1334LV6 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2.

3. Expresión estable del anticuerpo en el que se inserta CDR anti-FGF-8, utilizando células YB2/0

Utilizando los vectores de expresión de anticuerpo con CDR injertado antiFGF8 pKANTEX1334HV0LV0, pKANTEX1334HV0LV6 y pKANTEX1334HV6LV6 obtenidos en el apartado 2 del Ejemplo 2, se llevó a cabo la expresión estable de varios anticuerpos en los que se insertan CDR, anticuerpos anti-FGF-8 en las células YB2/0 según el procedimiento que se describe en el apartado 2(5) del Ejemplo 1.

4. Purificación del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8

El cultivo de los transformantes derivados de las células YB2/0 que expresan varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 2 y la purificación de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, a partir de los sobrenadantes del cultivo, se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3(2) del Ejemplo 1. Un anticuerpo derivado de un transformante introducido en pKANTEX1334HV0LV0 se denominó HV0LV0 y un anticuerpo derivado de un transformante introducido en pKANTEX1334HV6LV6, se denominó HV6LV6.

5. Análisis de anticuerpos en los que se insertó CDR, anticuerpos anti-FGF-8 purificados

El SDS-PAGE de varios anticuerpos en los que se insertó CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 4 del Ejemplo 2, se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 4 del Ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que cada anticuerpo se expresó y purificó como una molécula de anticuerpo de estructura correcta.

6. Medición de la actividad de unión del anticuerpo en el que se insertó CDR, anti-FGF-8 contra FGF-8. (ELISA)

La actividad para unirse a FGF-8 de varios anticuerpos en los que se insertó CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 4 del Ejemplo 2, se midió mediante el ELISA descrito en el apartado 2(6) del Ejemplo 1. El anticuerpo quimérico KM3334 anti-FGF-8, derivado de las células YB2/0, obtenido en el apartado 3(2) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo. Los resultados se muestran en la Figura 7. Tal como se muestra en la Figura 7, cada uno de los anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, mostraron una actividad de unión a FGF-8 similar a la de KM13334, de forma que no se observó una reducción significativa de la actividad de unión provocada por la inserción de CDR.

7. Medición de la actividad de unión para FGF-8 de los anticuerpos anti-FGF-8, en los que se insertó CDR

Para examinar con mayor detalle la actividad para unirse a FGF-8 de varios anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, obtenidos en el apartado 4 del Ejemplo 2, se midieron y compararon las actividades para unirse a FGF-8 de varios anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, utilizando BIAcore 2000 (preparado por BIACORE). El anticuerpo quimérico KM3334 anti-FGF-8 derivado de las células YB2/0, obtenido en el apartado 3(2) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo.

En adelante, HBS-EP (preparado por BIACORE) se utilizó como tampón para la dilución de muestras y durante la medición. En primer lugar, se dispuso un extremo sensor CM5 (fabricado por BIACORE), y se disolvió FGF-8 (preparado por R&D) para obtener una concentración de 31,25 $\mu\text{g/ml}$ utilizando 10 mmol/l de tampón acetato (pH 4,0), inmovilizándose en la superficie del extremo del sensor mediante un procedimiento de acoplamiento amínico. La cantidad inmovilizada fue de 4,498 RU.

A la célula de flujo inmovilizado de FGF-8, se añadieron 60 μl de cada solución del anticuerpo, con una velocidad de flujo de 20 $\mu\text{l/minuto}$, controlándose entonces la reacción de disociación durante 3 minutos. Después de la reacción de disociación, la superficie del extremo se regeneró añadiendo a la célula de flujo, dos veces de forma continuada, 20 μl de 10 mmol/l del tampón Glicina-HCl (pH 1,5). El ciclo se llevó a cabo para soluciones de anticuerpos de varias concentraciones (50 a 0,068 $\mu\text{g/ml}$), obteniéndose un sensorgrama en cada concentración. El sensorgrama de cada anticuerpo se llevó a cabo en un sensorgrama de reacción específica restando un sensorgrama obtenido utilizando un anticuerpo quimérico KM871 para GD3 [*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)] como un control negativo. El sensorgrama de 50 $\mu\text{g/ml}$ de cada anticuerpo se muestra en la Figura 8. Como se aprecia en el sensorgrama, la disociación apenas se observó cuando tuvo lugar la reacción de cada anticuerpo, de forma que fue difícil obtener una constante de disociación precisa. De acuerdo con esto, la comparación de la actividad de unión de varios anticuerpos se llevó a cabo comparando las alturas de unión [señal de resonancia (RU)] cuando se produce la reacción de unión. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 8, el anticuerpo quimérico KM3334 mostró la reacción más intensa de unión, y el anticuerpo HV0LV6 en el que se insertó CDR mostró una intensa reacción de unión similar a la de KM3334. Por otra parte, los anticuerpos HV0LV0 y HV6LV6 en los que se insertó CDR, mostraron una reacción de unión ligeramente más baja que KM3334 y HV0LV6. Los resultados anteriores muestran que es posible la comparación de las actividades de unión entre anticuerpos que no podrían ser reconocidos por ELISA, utilizando BIAcore, y que la actividad de unión del anticuerpo en el que se insertó CDR se recupera al mismo nivel del anticuerpo quimérico mediante la modificación de 6 residuos aminoácidos de FR de VL. Además, el efecto sobre el aumento de la actividad de unión no fue reconocido en los 6 residuos aminoácidos de FR de VH.

El anticuerpo HV0LV6 en el que se insertó CDR, derivado de las células YB2/0, que mostró una intensa reacción de unión similar a la del anticuerpo quimérico KM3334, se denominó KM8037 y la progenie celular transformada derivada de las células YB2/0 que expresaba intensamente KM8037, se denominó también KM8037. Asimismo, la progenie celular transformada KM8037 se depositó el 20 de junio de 2002, como FERM BP-8084 en el Organismo de Depósito Internacional de Patentes, Instituto Nacional de Ciencia Industrial Avanzada y Tecnología (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

Ejemplo 3

Preparación del anticuerpo anti-FGF-8 en el que se insertó CDR, que posee una inmunogenicidad más baja (1)

A partir de los resultados del Ejemplo 2, se reveló que el anticuerpo anti-FGF-8 en el que se insertó CDR, que mostraba una modificación de 6 residuos aminoácidos, derivado del anticuerpo murino KM1334, en FR de VL, muestra una actividad de unión similar a la del anticuerpo quimérico correspondiente. De acuerdo con esto, se examinó posteriormente el efecto de estos 6 residuos sobre la recuperación de la actividad, y los anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR que tienen actividad suficiente y contienen un número más pequeño de residuos aminoácidos derivados del anticuerpo murino y se espera que tengan una inmunogenicidad más reducida, se prepararon de la forma siguiente.

1. Diseño de la secuencia aminoácida de VL

Con respecto a los 6 residuos aminoácidos mencionados, se diseñaron las secuencias aminoácidas de 6 VL que presentan las modificaciones siguientes.

ES 2 303 859 T3

En LV.4-1, 4 residuos de Ile en posición 2, Gln en posición 50, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, se cambiaron a Val, Lys, Val y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

5 En LV.4-2, 4 residuos de Ile en posición 2, Thr en posición 14, Pro en posición 15 y Tyr en posición 92, se cambiaron a Val, Ser, Leu y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

10 En LV.3-1, 3 residuos de Ile en posición 2, Leu en posición 51 y Tyr en posición 92, se cambiaron a Val, Val y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

En LV.3-2, 3 residuos de Thr en posición 14, Pro en posición 15 y Tyr en posición 92, se cambiaron a Ser, Leu y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

15 En LV.2-1, 2 residuos de Leu en posición 51, y Tyr en posición 92, se cambiaron a Val y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

20 En LV.2-2, 2 residuos de Ile en posición 2, y Tyr en posición 92, se cambiaron a Val y Phe, respectivamente, que son residuos aminoácidos encontrados en el anticuerpo murino KM1334.

2. Construcción del ADNc que codifica VL

25 Los ADNc que codifican secuencias aminoácidas VL de los respectivos anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, diseñados en el apartado 1 del Ejemplo 3, se construyeron de la forma siguiente

(1) Construcción del ADNc que codifica LV.4-1

30 El ADNc que codifica LV.4-1 se construyó según el procedimiento que se describe en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, utilizando cuatro oligonucleótidos sintéticos de SEC ID nº 29, 32, 34 y 35 como fragmentos de ADN sintético (preparados por GENSET). Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM1334LV4-1 que contenía un ADNc que codifica LV.4-1.

(2) Construcción del ADNc que codifica LV.3-1

35 Utilizando como matriz 50 ng del plásmido pKM1334LV6 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, el cebador M13 RV (preparado por Takara Shuzo) y el ADN sintético que tiene la secuencia nucleótida descrita en SEC ID nº: 38 (preparada por GENSET) se añadieron como cebadores, para dar lugar a una concentración final de 0,3 $\mu\text{mol/L}$, llevándose a cabo una PCR según las instrucciones del fabricante adosadas a la KOD polimerasa (preparada por TOYOBO), calentando a 94°C durante 2 minutos en primer lugar, y llevando a cabo a continuación 35 ciclos a 94°C durante 15 segundos, 50°C durante 30 segundos y 68°C durante 1 minuto como un ciclo. La solución reactiva se purificó, el producto se disolvió en agua estéril, y se se llevó a cabo una reacción añadiendo 10 unidades de una enzima de restricción *KpnI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades de una enzima de restricción *SpeI* (preparada por Takara Shyzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,3 μg de un fragmento *KpnI-SpeI* de aproximadamente 0,22 kb.

45 A continuación, 3 μg del plásmido pKM1334LV4-1 obtenido en el apartado 2(1) del Ejemplo 3, se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *KpnI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar alrededor aproximadamente 2 μg de un fragmento *KpnI-KpnI* de aproximadamente 0,21 kb.

50 A continuación, 3 μg del plásmido pBluescript II SK(-) se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *KpnI* (preparada por Takara Shuzo) y 10 unidades del enzima de restricción *SpeI* (preparado por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 μg de un fragmento *KpnI-SpeI* de aproximadamente 2,95 kb.

55 A 10 μl en volumen total de agua estéril, se añadieron 0,1 μg del fragmento *KpnI-SpeI* del ADNc VL, 0,1 μg del fragmento *KpnI-KpnI* derivado del plásmido pKM1334LV4-1 y 0,1 μg del fragmento *KpnI-SpeI* del plásmido pBluescript II SK(-), obtenidos anteriormente, y se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). *E. coli* DH5 α se transformó utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante obtenida de este modo, para obtener 60 un plásmido pKM1334LV3-1 que representado en la Figura 9, que contiene un ADNc que codifica el LV.3-1

(3) Construcción del ADNc que codifica LV.2-1

65 Un plásmido pKM1334LV2-1 conteniendo un ADNc que codifica el LV.2-1, se obtuvo mediante un procedimiento similar al descrito en el apartado 2(1) del Ejemplo 2, excepto porque el plásmido pKM1334LV0 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, se utilizó en vez del plásmido pKM1334LV4-1.

(4) Construcción del ADNc que codifica LV.2-2

Un plásmido pKM1334LV2-2 conteniendo un ADNc que codifica el LV.2-2, se obtuvo mediante un procedimiento similar al descrito en el apartado 2(1) del Ejemplo 2, excepto porque el ADN sintético que se muestra en SEC ID n°:

37 se utilizó en vez del ADN sintético que se muestra en SEC ID n:36 como cebador.

(5) Construcción del ADNc que codifica LV.4-2

Se llevó a cabo una reacción mezclando 3 µg del plásmido pKM1334LV2-2 obtenido en el apartado 2(4) del Ejemplo 5, con 10 unidades de la enzima de restricción *KpnI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 µg de un fragmento *KpnI-KpnI* de aproximadamente 3,16 kb.

A continuación, 3 µg del plásmido pKM1334LV6 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *KpnI* (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,2 µg de un fragmento *KpnI-KpnI* de aproximadamente 0,21 kb.

A 10 µl en volumen total de agua estéril, se añadieron 0,1 µg del fragmento *KpnI-KpnI* derivado del plásmido pKM1334LV2-2 y 0,1 µg del fragmento *KpnI-KpnI* derivado del plásmido pKM1334LV6, obtenidos cada uno anteriormente, y que se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). *E. coli* DH5α se transformó utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante obtenida de este modo, para obtener el plásmido pKM1334LV4-2 que se muestra en la Figura 10, que contiene un ADNc que codifica el LV.4-2.

(6) Construcción del ADNc que codifica LV.3-2

Se llevó a cabo una reacción mezclando 3 µg del plásmido pKM1334LV4-2 obtenido en el apartado 2(5) del Ejemplo 3, con 10 unidades de la enzima de restricción *Tth111I* (preparada por Takara Shuzo) y *XmnI* (preparado por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2 µg de un fragmento *Tth111I-XmnI* de aproximadamente 2,24 kb.

A continuación, 3 µg del plásmido pKM1334LV0 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, se hicieron reaccionar con 10 unidades de las enzimas de restricción *Tth111I* (preparada por Takara Shuzo) y *XmnI* (fabricada por New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar alrededor de 1 µg de un fragmento *Tth111I-XmnI* de aproximadamente 1,11 kb.

A 10 µl en volumen total de agua estéril, se añadieron 0,1 µg del fragmento *Tth111I-XmnI* derivado del plásmido pKM1334LV4-2 y 0,1 µg del fragmento *Tth111I-XmnI* derivado del plásmido pKM1334LV0, obtenidos anteriormente, y que se unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). *E. coli* DH5α se transformó utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante obtenida de este modo, para obtener el plásmido pKM1334LV3-2 que se muestra en la Figura 11, que contiene un ADNc que codifica el LV.3-2.

3. Construcción del vector de expresión del anticuerpo en el que se insertó CDR, anti-FGF-8

Se construyeron varios vectores de expresión conteniendo ADNc-VL, del anticuerpo en el que se insertó CDR, anticuerpo anti-FGF-8, reemplazando el fragmento *EcoRI-BsiWI* que contiene el ADNc VL del vector de expresión pKANTEX1334HV0LV6 obtenido en el apartado 2 del Ejemplo 2, por cada uno de los diversos fragmentos *EcoRI-BsiWI* que contienen ADNc VL que se construyeron en el apartado 2 del Ejemplo 3. Específicamente, se construyeron 6 vectores, pKANTEX1334HV0LV4-1, pKANTEX1334HV0LV4-2, pKANTEX1334HV0LV3-1, pKANTEX1334HV0LV3-2, pKANTEX1334HV0LV2-1 y pKANTEX1334HV0LV2-2.

4. Expresión estable del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, utilizando las células CHO/DG44

La expresión estable de varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8 en las células CHO/DG44, se llevó a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 2(4) del Ejemplo 1, utilizando los vectores de expresión pKANTEX1334HV0LV0 y pKANTEX1334HV0LV6 de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8 obtenidos en el apartado 2 del Ejemplo 2 y los diversos vectores de expresión de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 3.

5. Purificación del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8

El cultivo de los transformantes derivados de las células CHO/DG44 que expresan varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 4 del Ejemplo 3, y la purificación de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, a partir de los sobrenadantes del cultivo, se llevaron a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 3(1) del Ejemplo 1. Un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV0, se denominó HV0LV0/CHO, un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV6, se denominó HV0LV6/CHO, un anticuerpo derivado

de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV4-1, se denominó HV0LV4-1/CHO, un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV4-2, se denominó HV0LV4-2/CHO, un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV3-1, se denominó HV0LV3-1/CHO, un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV3-2, se denominó HV0LV0/CH3-2, un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV2-1, se denominó HV0LV201/CHO, y un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introdujo pKANTEX1334HV0LV2-2, se denominó HV0LV2-2/CHO.

6. *Análisis del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, purificado*

El SDS-PAGE de varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 3, se llevó a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 4 del Ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que cada anticuerpo se expresó y purificó como una molécula de anticuerpo de estructura correcta.

7. *Medición de la actividad de unión del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, contra FGF-8 (Biosensor BIAcore)*

Para examinar con mayor detalle la actividad para unirse a FGF-8 de varios anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 3, se midieron y compararon las actividades para unirse a FGF-8 de varios anticuerpos anti-FGF-8 en los que se insertó CDR, utilizando BIAcore 2000 (preparado por BIACORE). El anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8 derivado de las células CHO/DG44 obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo.

En adelante, HBS-EP (preparado por Pharmacia) se utilizó como la solución tampón para la dilución de muestras y durante la medición. En primer lugar, se dispuso un extremo sensor SA (fabricado por BIACORE), y 5 μ l de un compuesto 1 preparado, marcado con biotina en el extremo C (un péptido extremo N de FGF-8, SEC ID n°: 15), se añadió a una solución de 0,05 μ g/ml a una velocidad de flujo de 20 μ l/minuto. A continuación, la superficie del extremo se lavó añadiendo dos veces, de forma continuada, 5 μ l de 10 mmol/l de tampón de Glicina-HCl (pH 1,5). La cantidad inmovilizada del péptido FGF-8 fue de 35 RU.

A la célula de flujo inmovilizado de FGF-8, se le añadieron 60 μ l de cada solución del anticuerpo, con una velocidad de flujo de 20 μ l/minuto, controlándose entonces la reacción de disociación durante 3 minutos. Después de la reacción de disociación, la superficie del extremo se regeneró añadiendo a la célula de flujo, dos veces de forma continuada, 20 μ l de 10 mmol/l del tampón Glicina-HCl (pH 1,5). El ciclo se llevó a cabo para soluciones de anticuerpos de varias concentraciones (50 a 1,85 μ g/ml), obteniéndose un sensorgrama en cada concentración. El sensorgrama de cada anticuerpo se llevó a cabo en un sensorgrama de reacción específica restando un sensorgrama obtenido utilizando un anticuerpo quimérico KM871 para GD3 [*Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 373 (1993)] como un control negativo.

El sensorgrama de 16,7 μ g/ml de cada anticuerpo se muestra en la Figura 12. Como se aprecia en el sensorgrama, la disociación apenas se observó cuando tuvo lugar la reacción de disociación de cada anticuerpo, de forma que fue difícil obtener una constante de disociación precisa. De acuerdo con esto, la comparación de la actividad de unión de varios anticuerpos se llevó a cabo comparando la intensidad de unión [señal de resonancia (RU)] cuando se produce la reacción de unión.

Como resultado, tal como se muestra en la Figura 12, los anticuerpos quiméricos KM3034 y HV0LV6/CHO mostraron la reacción más intensa de unión, seguido por HV0LV3-1/CHO, HV0LV4-1/CHO y HV0LV2-1/CHO, en este orden. Por otra parte, HV0LV3-2/CHO, HV0LV2-2/CHO y HV0LV4-2/CHO, mostraron una reacción baja de unión y HV0LV0/CHO mostró la reacción de unión más baja. Estos resultados coincidieron con los resultados que utilizan los anticuerpos en los que se insertó CDR, anticuerpos anti-FGF derivados de las células YB2/0 que se describen en el apartado 7 del Ejemplo 2.

8. *Medida de la actividad de neutralización para FGF-8 de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8*

La evaluación de la actividad de neutralización de los anticuerpos en los que se ha insertado CDR, anticuerpos anti-FGF-8 HV0LV6/CHO, HV0LV3-1/CHO, HV0LV4-1/CHO y HV0LV2-1/CHO, cuya intensa reacción de unión para FGF-8 se confirmó en el apartado 7 del Ejemplo 3, se llevó a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 5 del Ejemplo 2. El anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8 derivado de las células CHO/DG44, obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo, y el anticuerpo quimérico KM2760 para la quemoquina CCR4 que se describe en WO 01/64754 como un control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 13. Como se muestra en la Figura 13, HV0LV6/CHO mostró una actividad de neutralización de FGF-8 similar a la del anticuerpo quimérico KM3034, y el HV0LV3-1/CHO mostró la próxima intensa actividad de neutralización de FGF-8. El HV0LV4-1/CHO mostró una actividad de neutralización de FGF-8 ligeramente más baja que HV0LV3-1/CHO, y el HV0LV2-1/CHO mostró la actividad de neutralización más baja.

Ejemplo 4

Preparación del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8 que posee una inmunogenicidad baja
(2)

Se encontró a partir de los resultados del Ejemplo 4, que entre las modificaciones de los 6 residuos aminoácidos de LV6, fue esencial la modificación en la posición 51 para la recuperación de la actividad. Asimismo, se sugirió que la modificación en la posición 2 tiene un efecto pequeño para la recuperación de la actividad mediante su sola modificación, pero contribuye a la recuperación de la actividad de modo cooperativo por su combinación con la modificación de la posición 51. Con respecto a las modificaciones en las posiciones 14 y 15, se sugirió asimismo que contribuyen a la recuperación de la actividad en cooperación, por su combinación, con las modificaciones en la posición 51. Por otra parte, se sugirió que el efecto de la modificación de la posición 50, es pequeño. De acuerdo con esto, para examinar cual de las modificaciones en la posición 2 y las modificaciones en la posición 14 ó 15 tiene un efecto más intenso sobre la recuperación de la actividad, así como para examinar el efecto de la modificación en la posición 92, se llevó a cabo otra vez la preparación de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8.

1. Rediseño de las secuencias aminoácidas VL

Se diseñaron las secuencias aminoácidas de dos VL que tienen las modificaciones siguientes. Cada caso muestra modificaciones de los residuos aminoácidos de LV.0

En LV.4-3, 4 residuos de Thr en la posición 14, Pro en la posición 15, Leu en la posición 51 y Tyr en la posición 92, se cambiaron a Ser, Leu, Val y Phe, respectivamente, cuyos residuos aminoácidos se encontraron en el anticuerpo murino KM1334.

En LV.3-3, 3 residuos de Thr en posición 14, Pro en posición 15 y Leu en posición 51, se cambiaron a Ser, Leu y Val, respectivamente, cuyos residuos aminoácidos se encontraron en el anticuerpo murino KM1334.

2. Construcción del ADNc que codifica VL

Los ADNc que codifican las secuencias aminoácidas respectivas de VL del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, secuencias diseñadas en el apartado 1 del ejemplo 4, se construyeron de la siguiente manera.

(1) Construcción del ADNc que codifica LV.4-3

Este se construyó según el procedimiento que se describe en el apartado 2 (5) del Ejemplo 3. Sin embargo, el plásmido pKM1334LV2-1 obtenido en el apartado 2(3) del Ejemplo 3, se utilizó en vez del plásmido pKM1334LV2-2 y el plásmido pKM1334LV3-2 obtenido en el apartado 2(6) del Ejemplo 3, se utilizó en vez del plásmido pKM1334LV6. Como resultado, se obtuvo un plásmido pKM1334LV4-3 que contenía un ADNc que codifica LV.4-3.

(2) Construcción del ADNc que codifica LV.3-3

Se llevó a cabo una reacción mezclando 3 μ g del plásmido pKM1334LV4-3 obtenido en el apartado 2(1) del Ejemplo 4 con 10 unidades de la enzima de restricción *Bam*HI (preparada por Takara Shuzo y 10 unidades de la enzima de restricción *Spe*I (preparado por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 2,5 μ g de un fragmento *Bam*HI-*Spe*I de aproximadamente 3,23 kb.

A continuación, 3 μ g del plásmido pKM1334LV0 obtenido en el apartado 1(3) del Ejemplo 2, se hicieron reaccionar con 10 unidades de la enzima de restricción *Bam*HI (preparada por TAKARA SHUZO y 10 unidades de la enzima de restricción *Spe*I (preparada por Takara Shuzo) a 37°C durante 1 hora. La solución reactiva se fraccionó mediante electroforesis en gel de agarosa para recuperar aproximadamente 0,15 μ g de un fragmento *Bam*HI-*Spe*I de aproximadamente 0,13 kb.

A 10 μ l en un volumen total de agua estéril, 0,1 μ g del fragmento *Bam*HI-*Spe*I derivado del plásmido pKM1334LV4-3 y 0,1 μ g del fragmento *Bam*HI-*Spe*I derivado del plásmido pKM1334LV0, cada uno de ellos obtenidos anteriormente, se le añadieron y unieron utilizando Ligation High (preparado por TOYOBO). *E. coli* DH5 α se transformó utilizando la solución de ADN plasmídico recombinante obtenido de esta forma, para obtener el plásmido pKM1334LV3-3 que se muestra en la Figura 14 que contiene un ADNc que codifica el LV.3-3.

3. Construcción de vectores de expresión del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8

Se construyeron varios vectores de expresión de anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, (vectores) que poseen varios ADNc VL, reemplazando el fragmento *Eco*RI-*Bsi*WI que contiene el ADNc VL del vector de expresión pKANTEX1334HV0LV6 obtenido en el apartado 2 del Ejemplo 2, por los fragmentos *Eco*RI-*Bsi*WI que contienen varios ADNc VL contruidos en el apartado 2 del Ejemplo 4. Específicamente, se construyeron 2 vectores pKANTEX1334HV0LV4-3 y pKANTEX1334HV0LV3-3.

4. *Expresión estable del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, utilizando células CHO/DG44*

La expresión estable de varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, en las células CHO/DG44, se llevó a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 2(4) del ejemplo 1, utilizando varios vectores de expresión del anticuerpo en el que se inserta CDR, anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 3 del Ejemplo 4.

5. *Purificación de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8*

El cultivo de los transformantes derivados de las células CHO/DG44 que expresan varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 4 del ejemplo 4, y la purificación de los anticuerpos en los que se inserta VDR, anticuerpos anti-FGF-8, a partir de los sobrenadantes del cultivo, se llevaron a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 3(1) del Ejemplo 1. Un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introduce pKANTEX1334HV0LV4-3 se denominó HV0LV4-3/CHO, y un anticuerpo derivado de un transformante en el que se introduce pKANTEX1334HV0LV3-3, se denominó HV0LV3-3/CHO.

6. *Análisis del anticuerpo purificado en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8*

El SDS-PAGE de varios anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 4, se llevó a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 4 del Ejemplo 1. Como resultado, se confirmó que cada anticuerpo se expresó y purificó como una molécula de anticuerpo de estructura correcta.

7. *Medición de la actividad de unión para FGF-8 de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8*

Las actividades de unión para FGF-8 de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, HV0LV6/CHO y HV0LV3-1/CHO obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 3 y de los anticuerpos injertados con CDR anti-FGF-8 HV0LV4-3/CHO y HV0LV3-3/CHO obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 4, se midieron según el procedimiento que se describe en el apartado 7 del Ejemplo 3. El anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8 derivado de las células CHO/DG44, obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo.

El sensorgrama de 16,7 µg/ml de cada anticuerpo se muestra en la Figura 15. Como se deduce del sensorgrama, la disociación apenas se observó cuando se produjo la reacción de disociación de cada anticuerpo, de forma que fue difícil obtener una constante precisa de disociación. De acuerdo con esto, la actividad de unión de los anticuerpos respectivos se llevó a cabo comparando la intensidad de la unión [señal de resonancia (RU)] cuando tuvo lugar la reacción de unión. Como resultado, tal como se muestra en la Figura 15, los anticuerpos quiméricos KM3034 mostraron la reacción de unión más intensa, y HV0LV4-3/CHO mostró una reacción de unión que fue más intensa que la de HV0LV3-1/CHO y similar a la de HV0LV3-3/CHO. La reacción de unión de HV0LV3-3/CHO fue más suave que la de HV0LV3-1. A partir de los resultados anteriores, se sugirió que con respecto a la altura de la reacción de unión, la modificación en la posición 14 ó 15 funciona de forma más cooperativa que la modificación en la posición 2, y la modificación en la posición 92, es esencial para la recuperación de la actividad.

8. *Medición de la actividad de neutralización, para FGF-8, del anticuerpo en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8*

La evaluación de la actividad de neutralización de los anticuerpos en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, HV0LV6/CHO y HV0LV3-1/CHO, obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 3 y los anticuerpos en los que se inserta CDR, anti-FGF-8, HV0LV4-3/CHO y HV0LV3-3/CHO, obtenidos en el apartado 5 del Ejemplo 4, se llevó a cabo según el procedimiento que se describe en el apartado 5 del ejemplo 2. El anticuerpo quimérico KM3034 anti-FGF-8, derivado de las células CHO/DG44, obtenido en el apartado 3(1) del Ejemplo 1, se utilizó como un control positivo, y el anticuerpo quimérico KM2760 para la quemoquina humana CCR4 que se describe en WO 01/64754, como un control negativo. Los resultados se muestran en la Figura 16. Como se muestra en la Figura 16, HV0LV6/CHO y HV0LV3-1/CHO mostraron similares actividades de neutralización de FGF-8 con respecto al anticuerpo quimérico KM3034. Por otra parte, HV0LV4-3/CHO y HV0LV3-3/CHO mostraron casi la misma actividad de neutralización, y la actividad fue de aproximadamente la mitad de la del anticuerpo quimérico KM3034. La actividad de neutralización de HV0LV3-1/CHO y HV0LV4-3/CHO no se correlacionó con la altura de la reacción de unión mediante BIAcore, y se sugirió que el residuo aminoácido en posición 2 y los residuos aminoácidos en posiciones 14 y 15, poseen influencias independientes sobre la actividad de unión para FGF-8 y la actividad de neutralización de FGF-8 para las células.

Basándose en los resultados anteriores de las evaluaciones respectivas, el anticuerpo HV0LV6/CHO en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, derivado de las células CHO/DG44, que mostró una intensa reacción de unión y una actividad de neutralización para FGF-8 similar a las del anticuerpo quimérico KM3034, se denominó KM8034, y el clon de células transformadas derivadas de las células CHO/DG44 que expresaba intensamente KM8034, se denominó KM8034 de la misma forma. Asimismo, el anticuerpo HV0LV4-3/CHO en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8, derivado de las células CHO/DG44, que mostraba una reacción intensa de unión similar a la de KM8034, se denominó KM8035, y la progenie celular transformada, derivada de las células CHO/DG44, que expresaba intensamente KM8035, se denominó KM8035, de la misma forma. La secuencia aminoácida de VL, LV.4-3 de KM8035

se muestra en SEC ID nº: 38. Además, la progenie celular transformada International Patent Organism Depositary KM8035 se ha depositado el 20 de junio de 2002, como FERM BP-8082 en el National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

Además, el anticuerpo injertado con CDR derivado de las células CHO/DG44 HV0LV3-1/CHO que mostró una elevada reacción de unión similar a la de KM8034 se denominó KM8036, y la línea celular transformada derivada de células CHO/DG44 que expresa intensamente KM8036 se denominó KM8036 de la misma manera. La secuencia aminoácida LV.3-1 de VL de KM8036 es representada en la SEC ID nº:39. Asimismo, la línea celular transformada KM8036 se depositó el 20 de Junio de 2002, como FERM BP-8083 en el International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-Chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken 305-8566, Japón).

Ya que el anticuerpo KM8034 en el que se inserta CDR, anticuerpo anti-FGF-8 muestra una reacción intensa de unión y una actividad de neutralización de FGF-8 similar a la del anticuerpo quimérico KM3034, y que la inmunogenicidad en el hombre está reducida respecto al anticuerpo quimérico, se espera que sus efectos terapéuticos sean más intensos que los del anticuerpo quimérico. Aunque existe una posibilidad de que la actividad de unión y la de neutralización de FGF-8 del los anticuerpos KM8036 y KM8035 en los que se inserta CDR, anticuerpos anti-FGF-8, están ligeramente reducidas en comparación con 8034, los residuos aminoácidos de la región V FR derivados del anticuerpo murino KM1334, son 3 residuos y 4 residuos, respectivamente, de forma que se espera que se produzca posteriormente una inmunogenicidad más reducida que con KM8034.

Aplicabilidad industrial

La presente invención proporciona un anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo del mismo, que reacciona específicamente con FGF-8 que se considera como el factor de crecimiento del cáncer prostático, cáncer mamario, cáncer ovárico y similares, y que inhibe además la función de FGF-8.

Texto libre de los listados de secuencias:

SEC ID nº: 11- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 12- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 13- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 14- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 20- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 21- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 22- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 23- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 24- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 25- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 26- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 27- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 28- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 29- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 30- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 31- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 32- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 33- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 34- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

ES 2 303 859 T3

SEC ID nº: 35- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

SEC ID nº: 36- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

5 SEC ID nº: 37- explicación de secuencia artificial: ADN sintético

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo humanizado neutralizante contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) o un fragmento de anticuerpo del mismo, en el que la región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16, y en el que la región V de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 19.

2. Anticuerpo humanizado neutralizante contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) o un fragmento de anticuerpo del mismo, en el que la región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16, y en el que la región V de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 38.

3. Anticuerpo humanizado neutralizante contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 (FGF-8) o un fragmento de anticuerpo del mismo, en el que la región variable (región V) de la cadena pesada (cadena H) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 16, y en el que la región V de la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo comprende la secuencia aminoácida representada por SEC ID n°: 39.

4. Fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el fragmento de anticuerpo es seleccionado de entre el grupo constituido por Fab, Fab', F(ab')₂, un anticuerpo de cadena única (scFv), un fragmento de la región (región V) variable dimerizada (diacuerpo), un fragmento de la región V estabilizado por disulfuro (dsFv), y un péptido que comprende una región determinante de complementariedad (CDR).

5. ADN que codifica el anticuerpo humanizado o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

6. Vector recombinante que comprende el ADN según la reivindicación 5.

7. Transformante obtenido introduciendo el vector recombinante según la reivindicación 6 en una célula huésped.

8. Procedimiento para producir un anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo, que comprende cultivar el transformante según la reivindicación 7 en un medio para preparar y acumular el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en el cultivo, y recuperar el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo del mismo a partir del cultivo.

9. Medicamento que comprende, como principio activo, por lo menos uno seleccionado de entre el anticuerpo y el fragmento de anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

FIG. 1

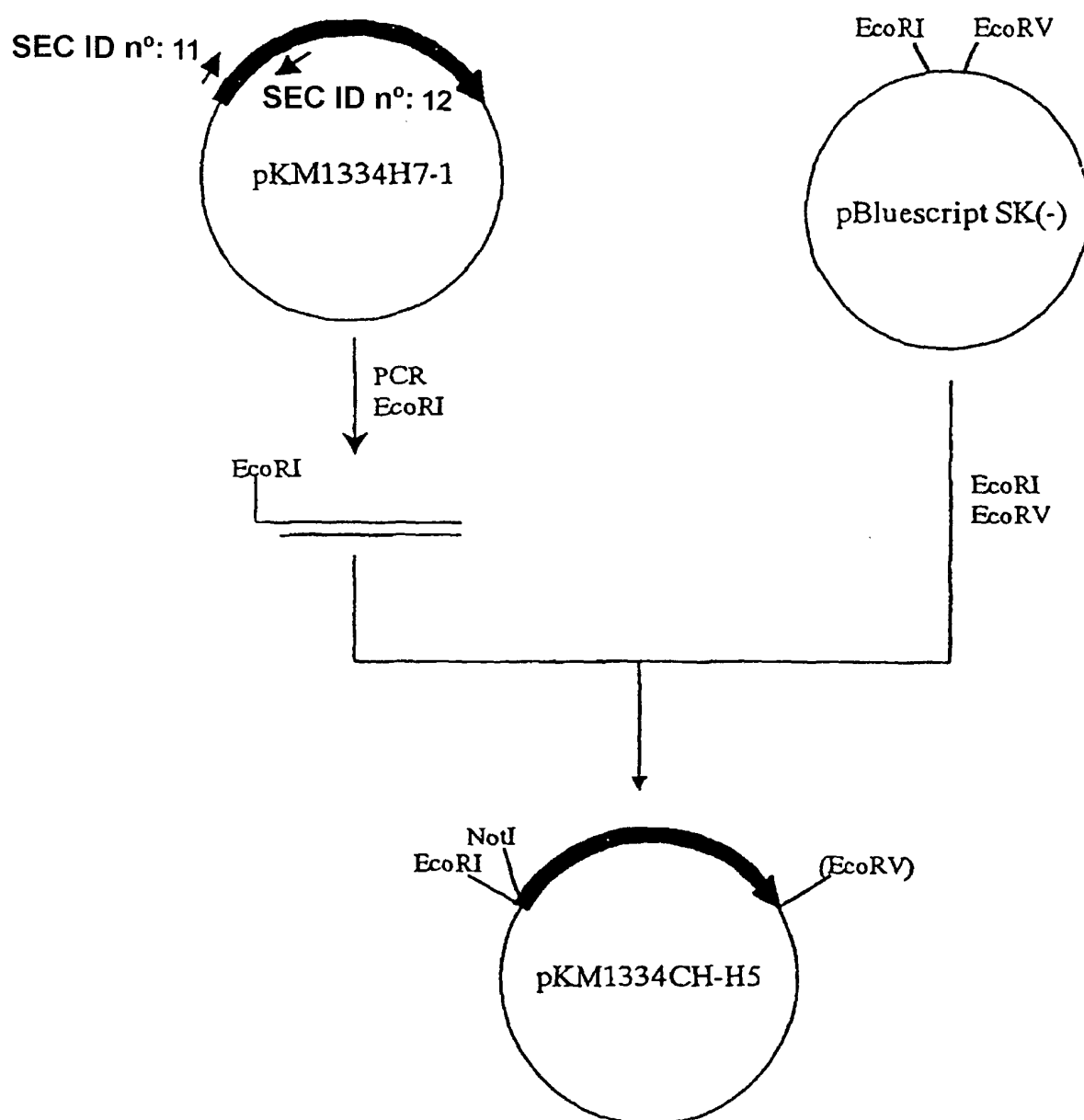


FIG. 2

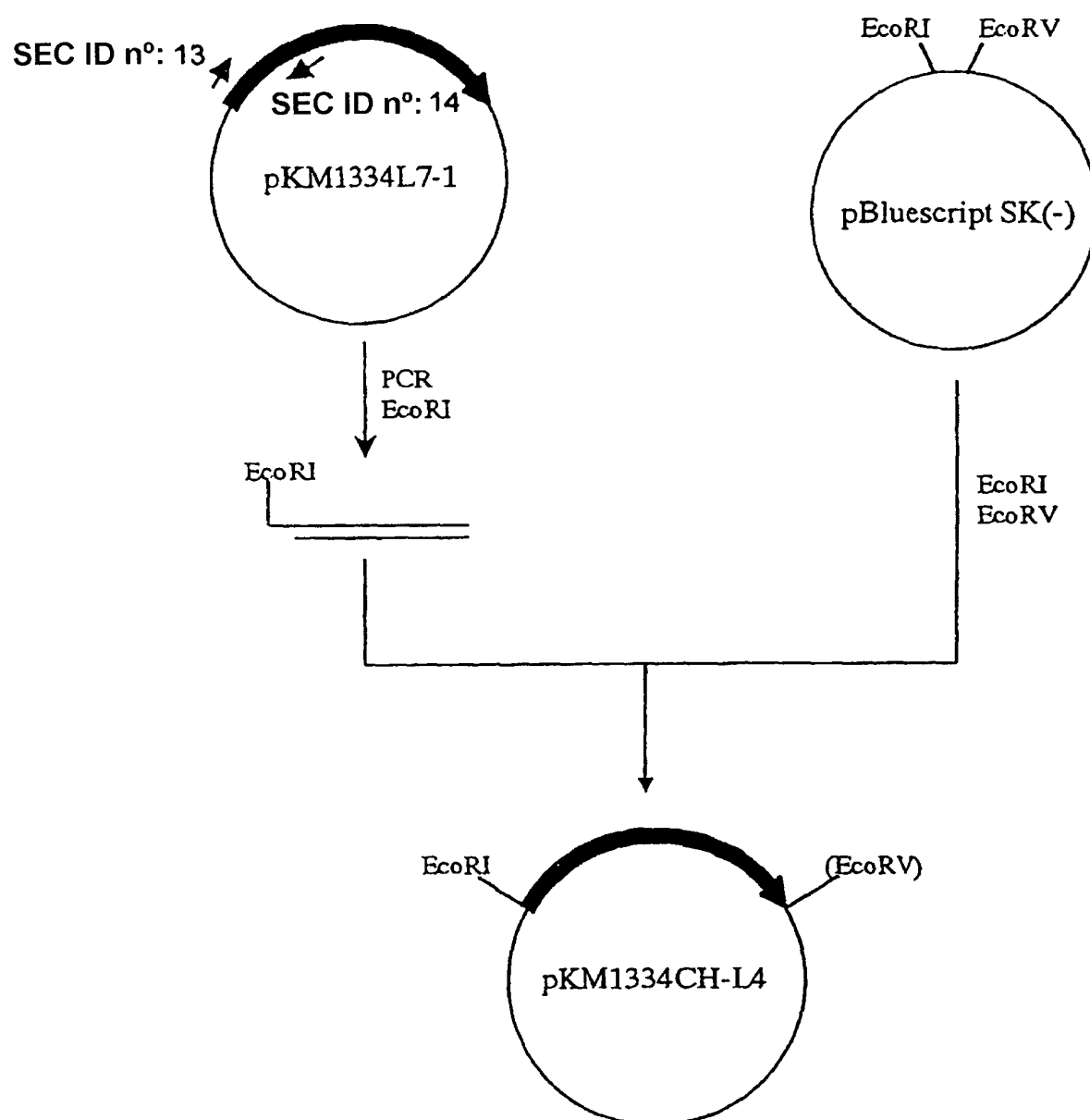


FIG. 3

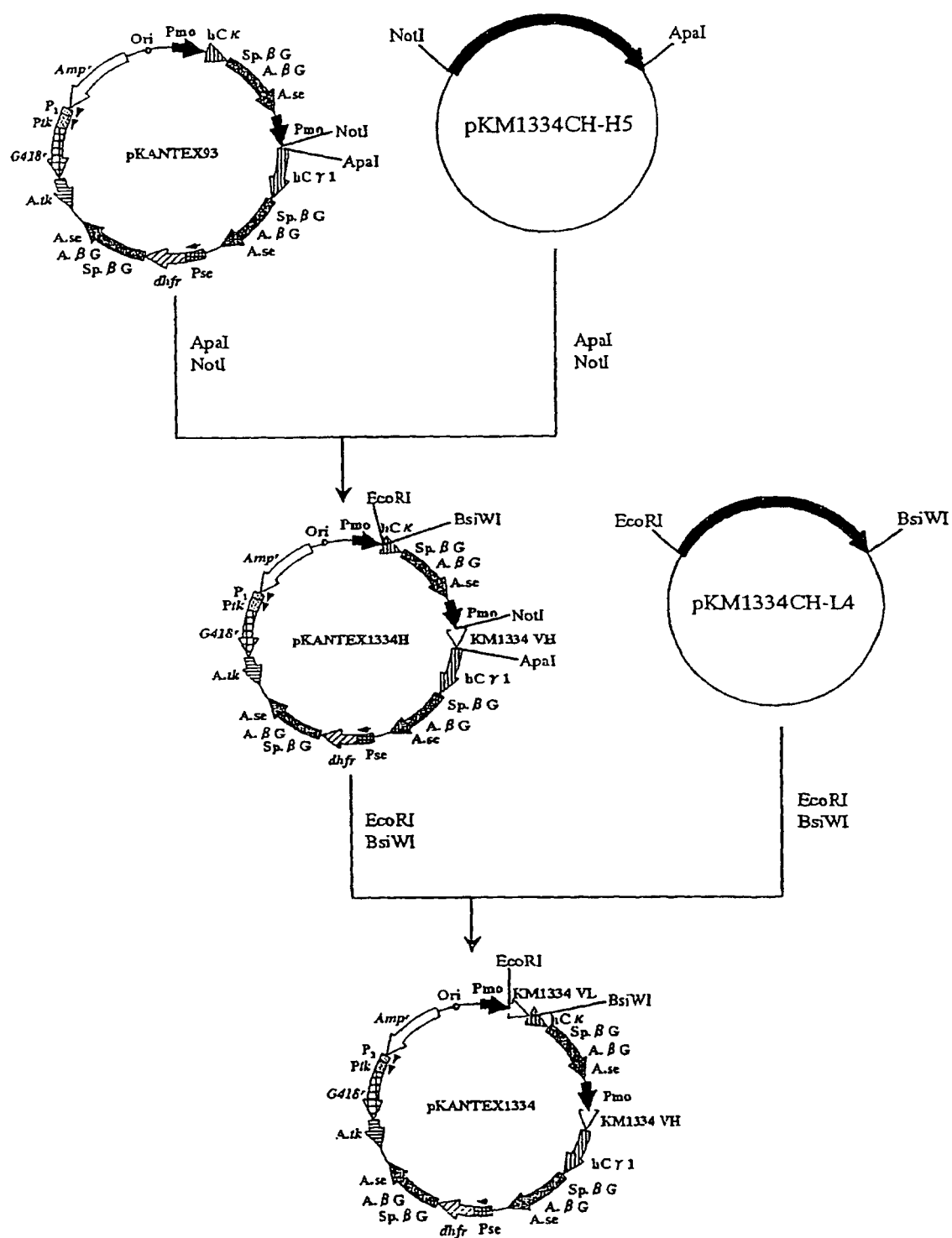


FIG. 4

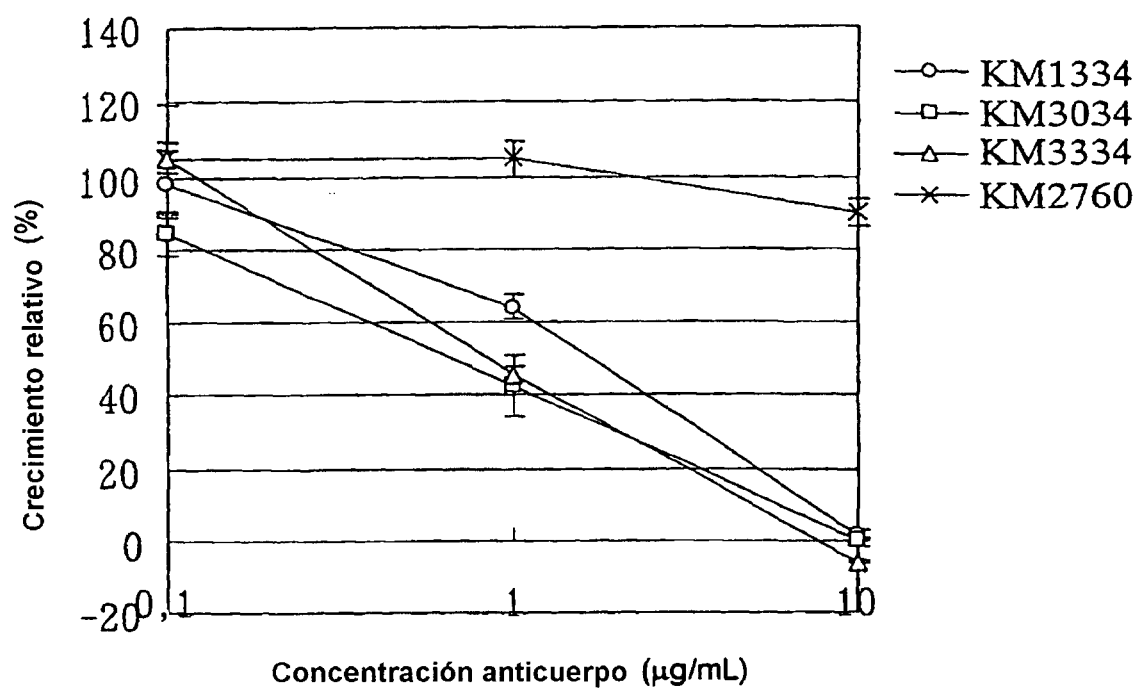


FIG. 5

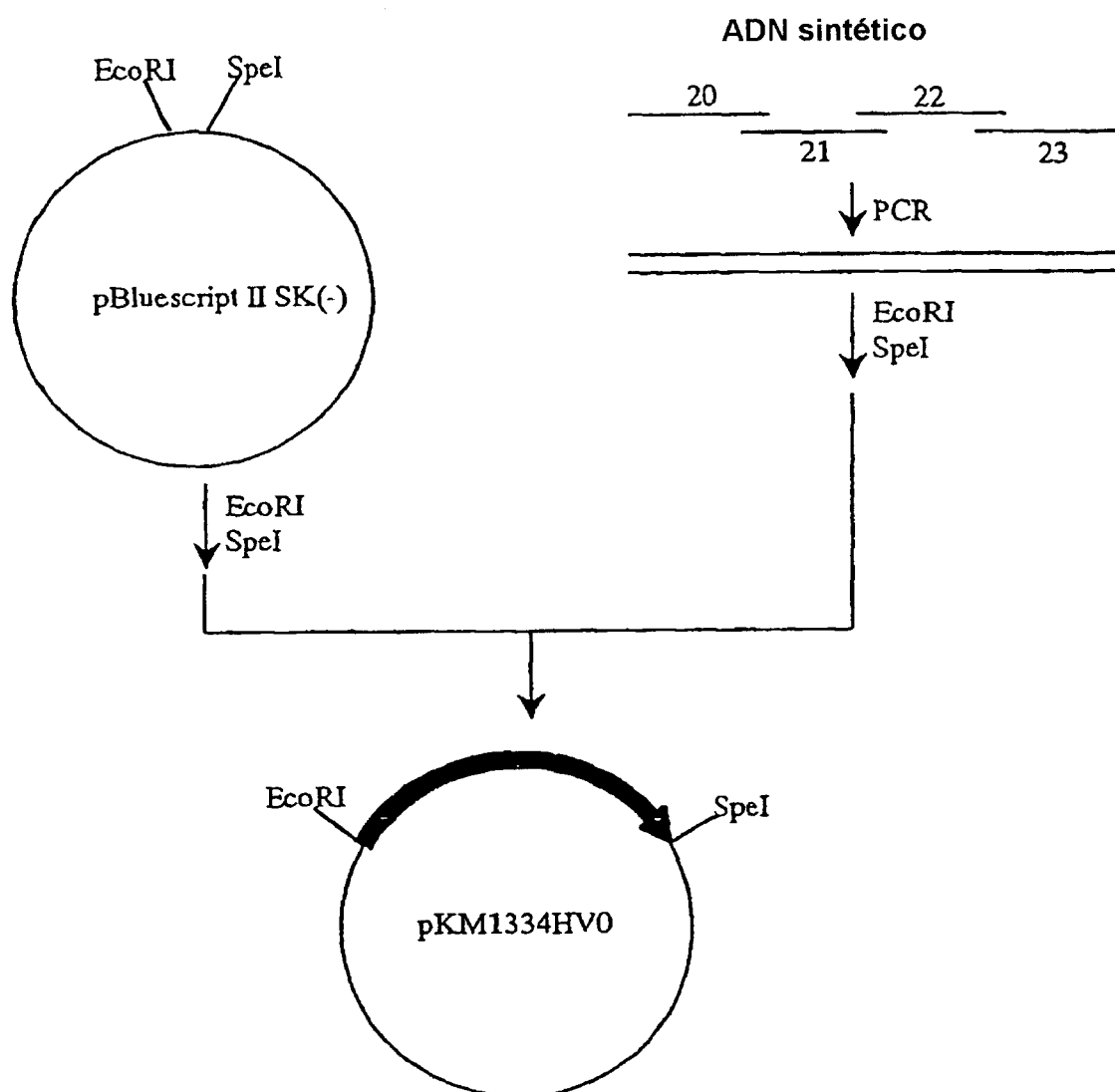


FIG. 6

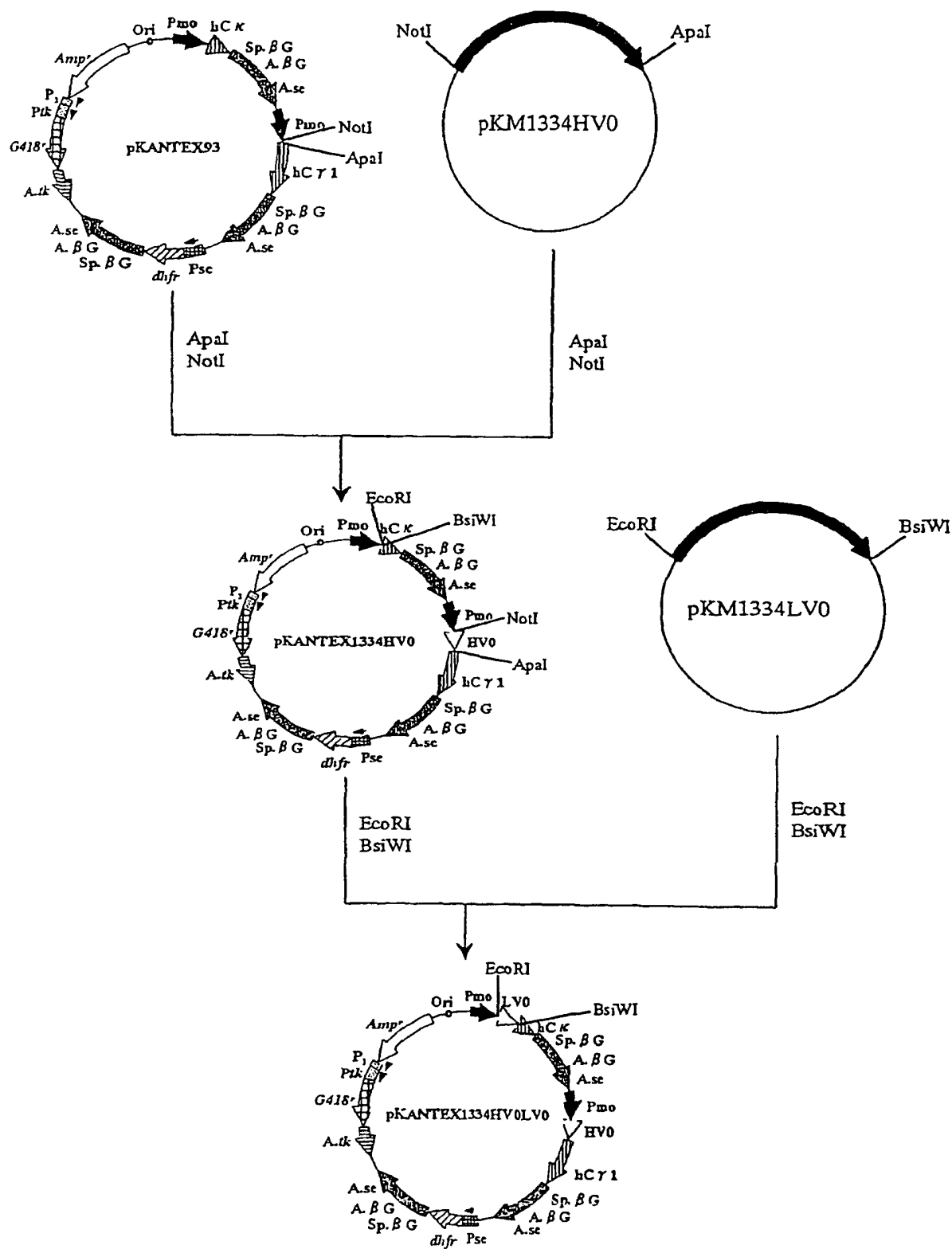


FIG. 7

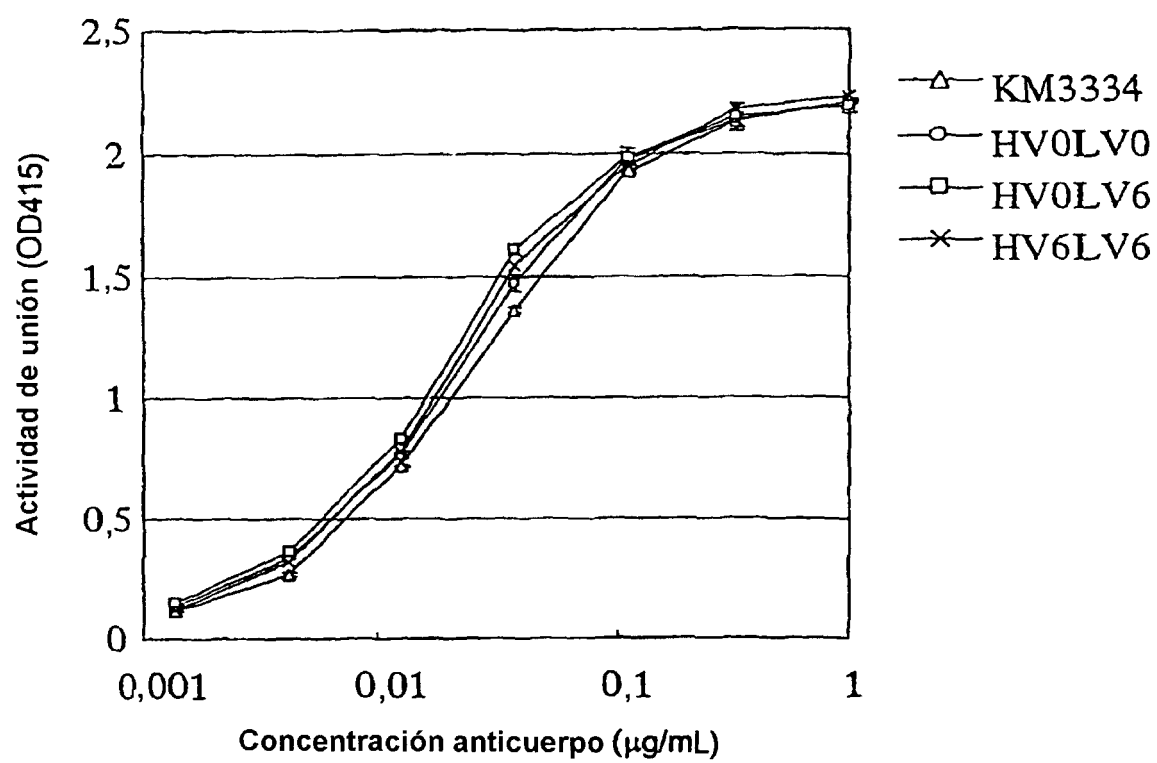


FIG. 8

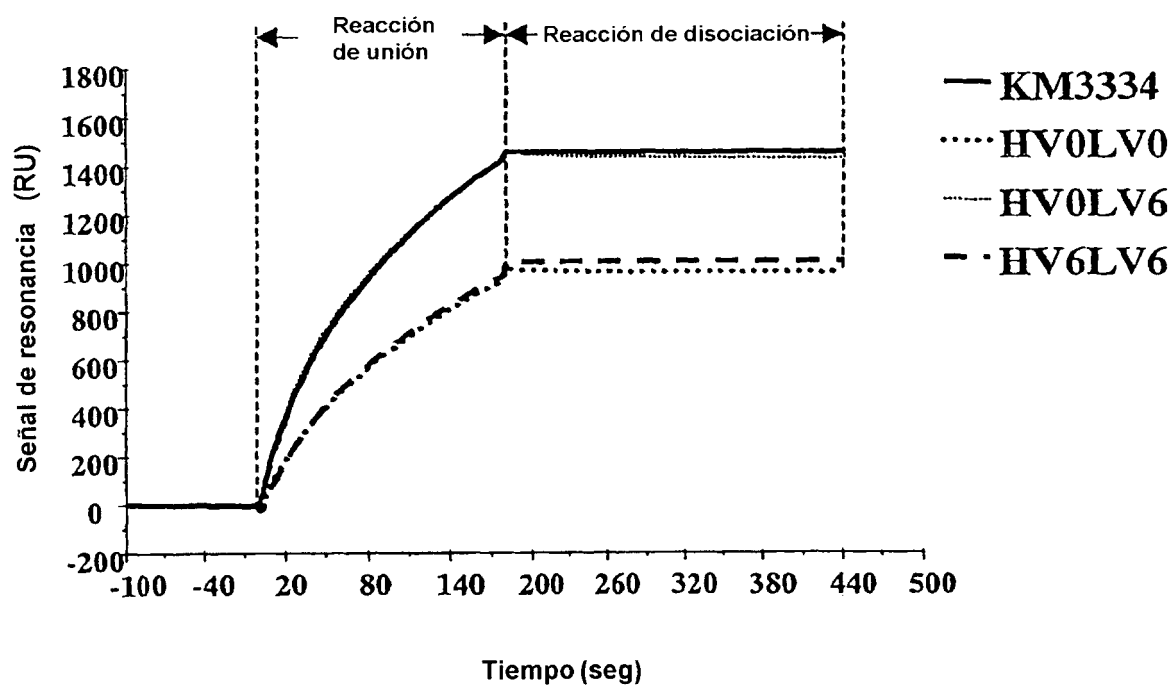


FIG. 9

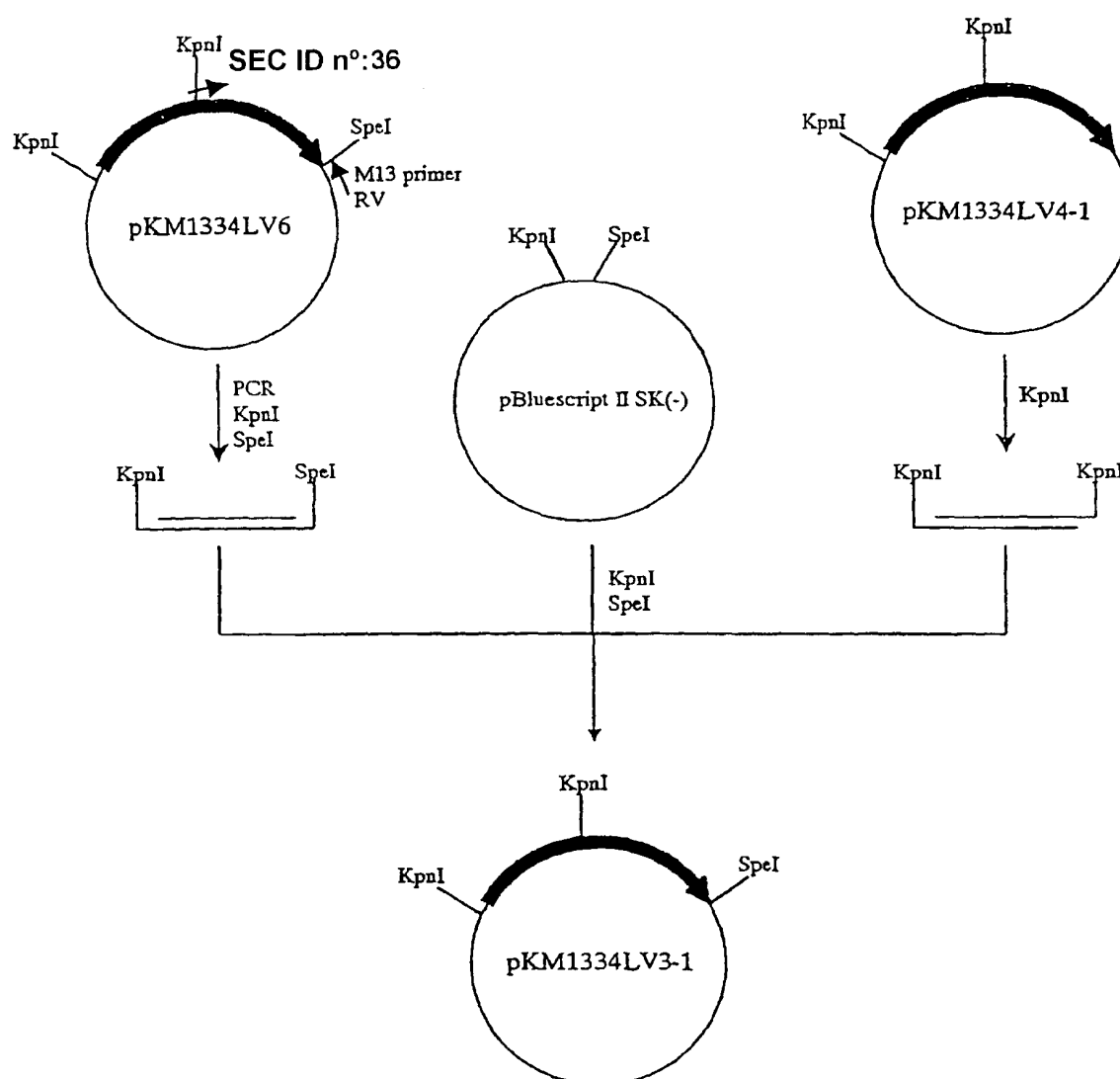


FIG. 10

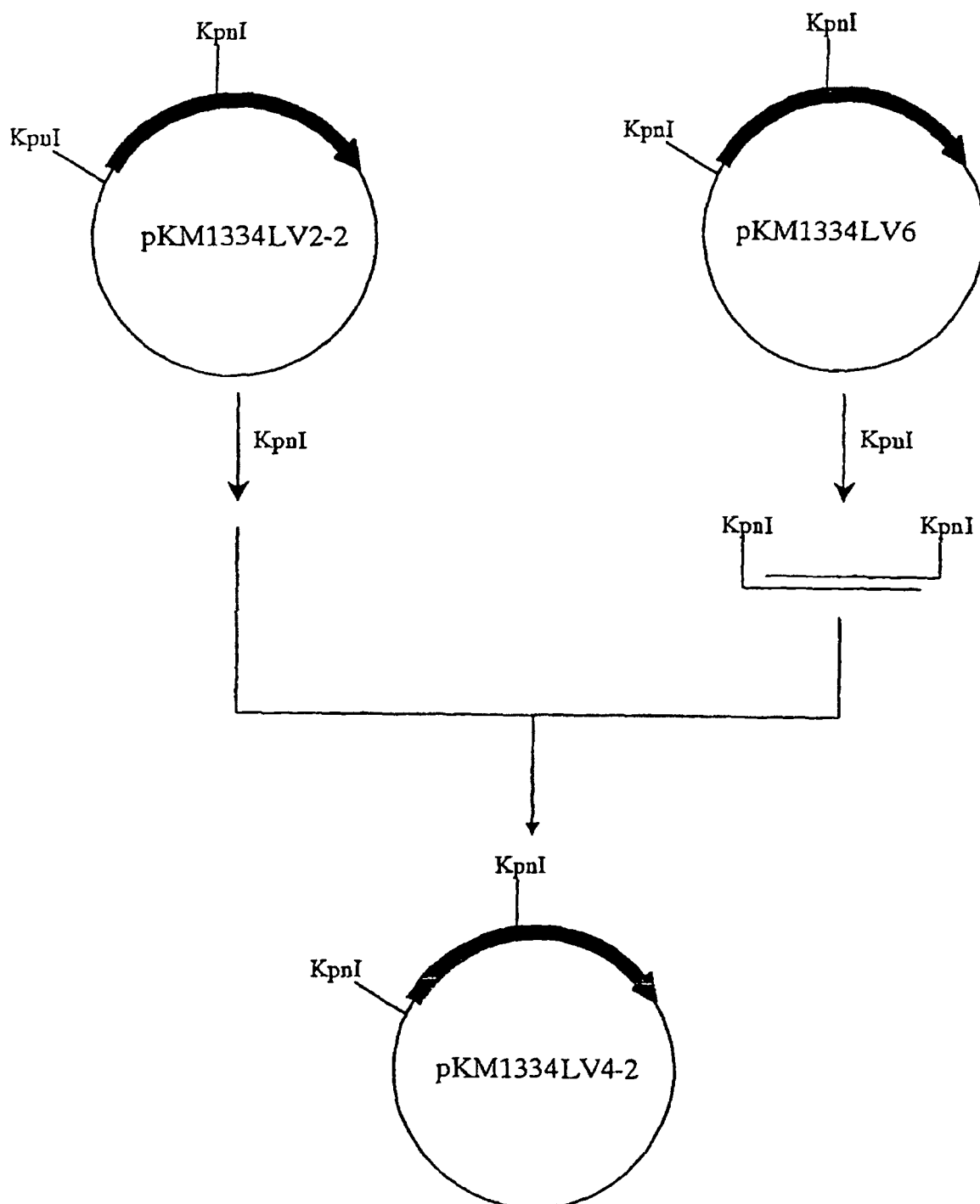


FIG. 11

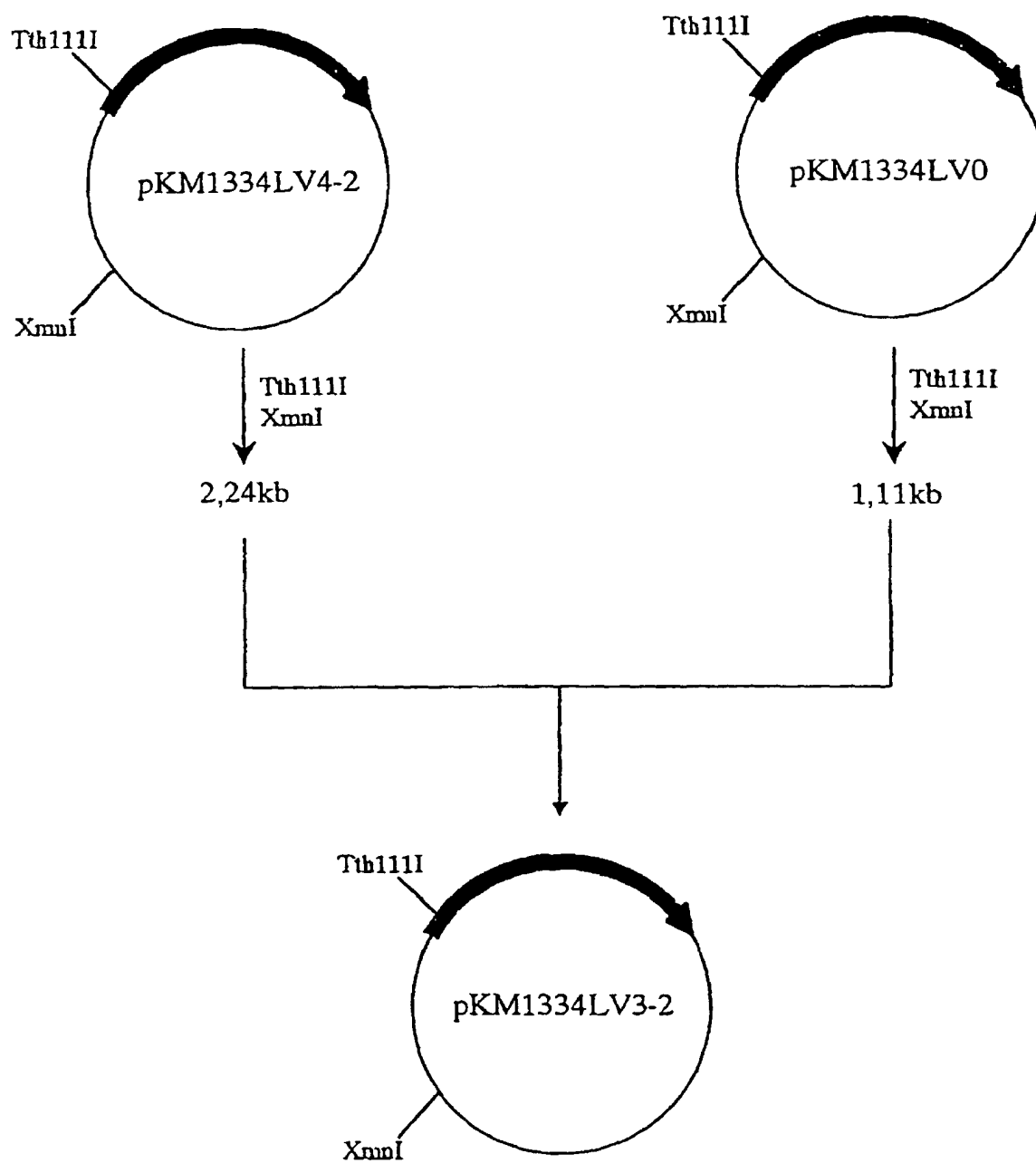


FIG. 12

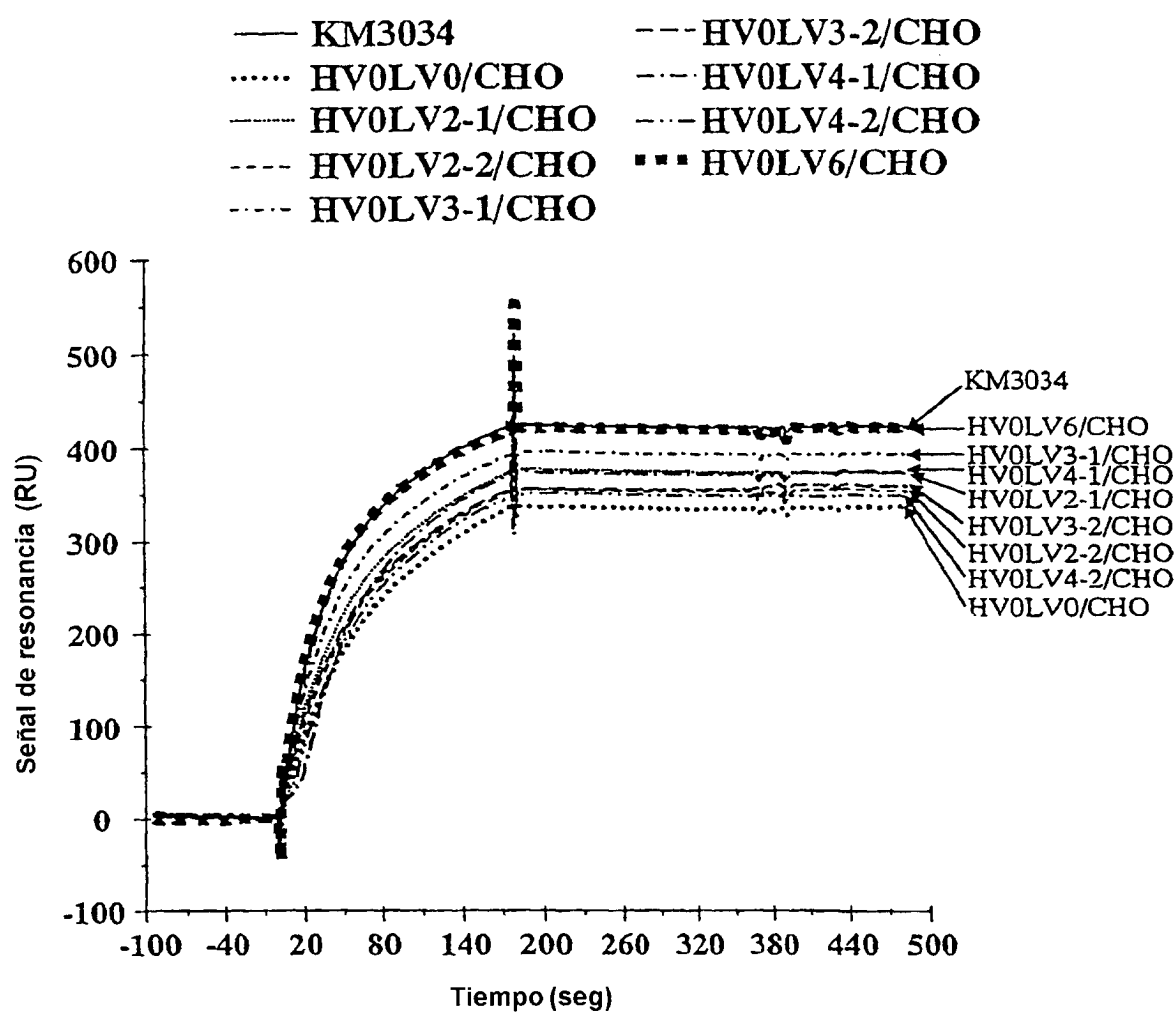


FIG. 13

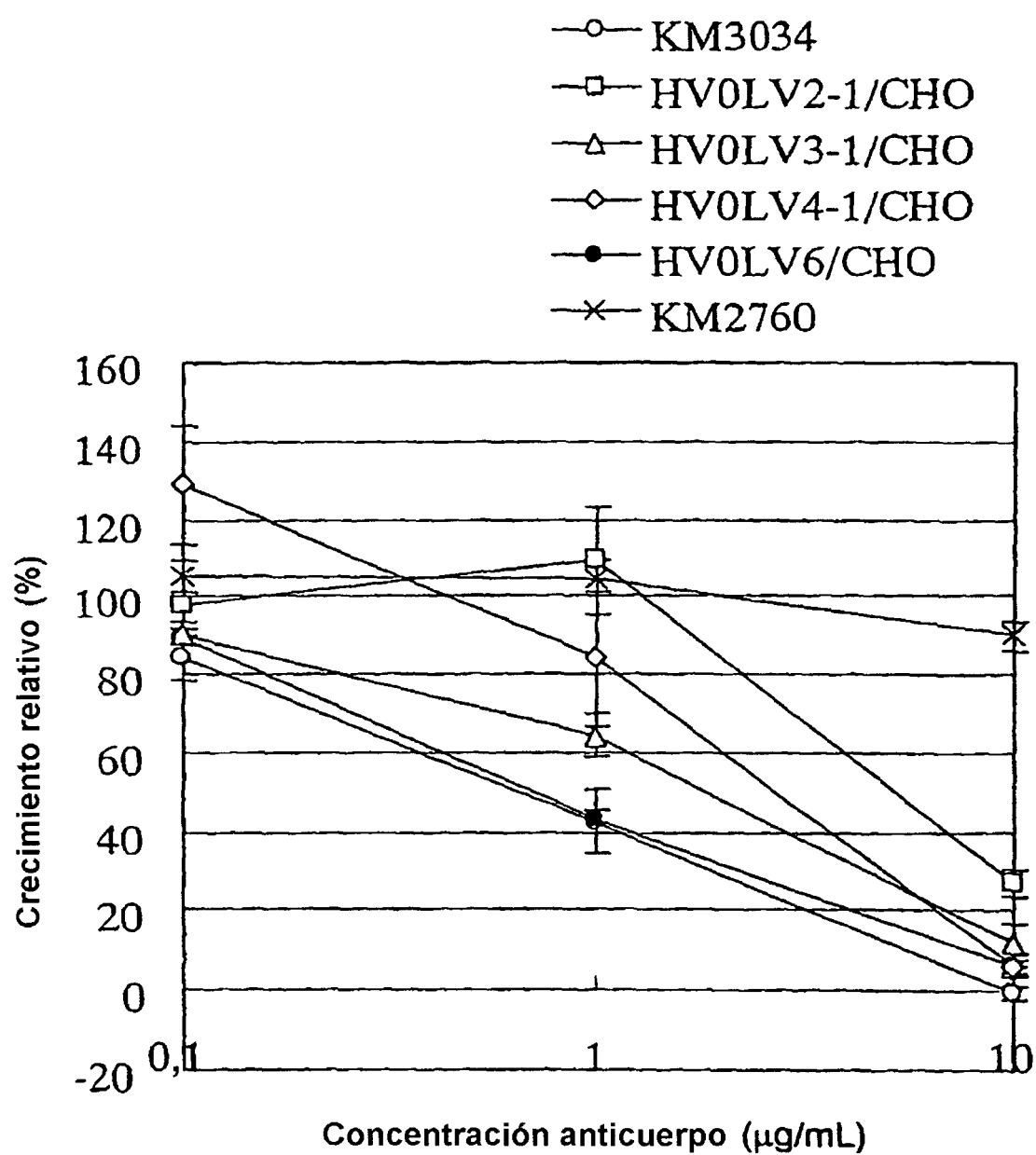


FIG. 14

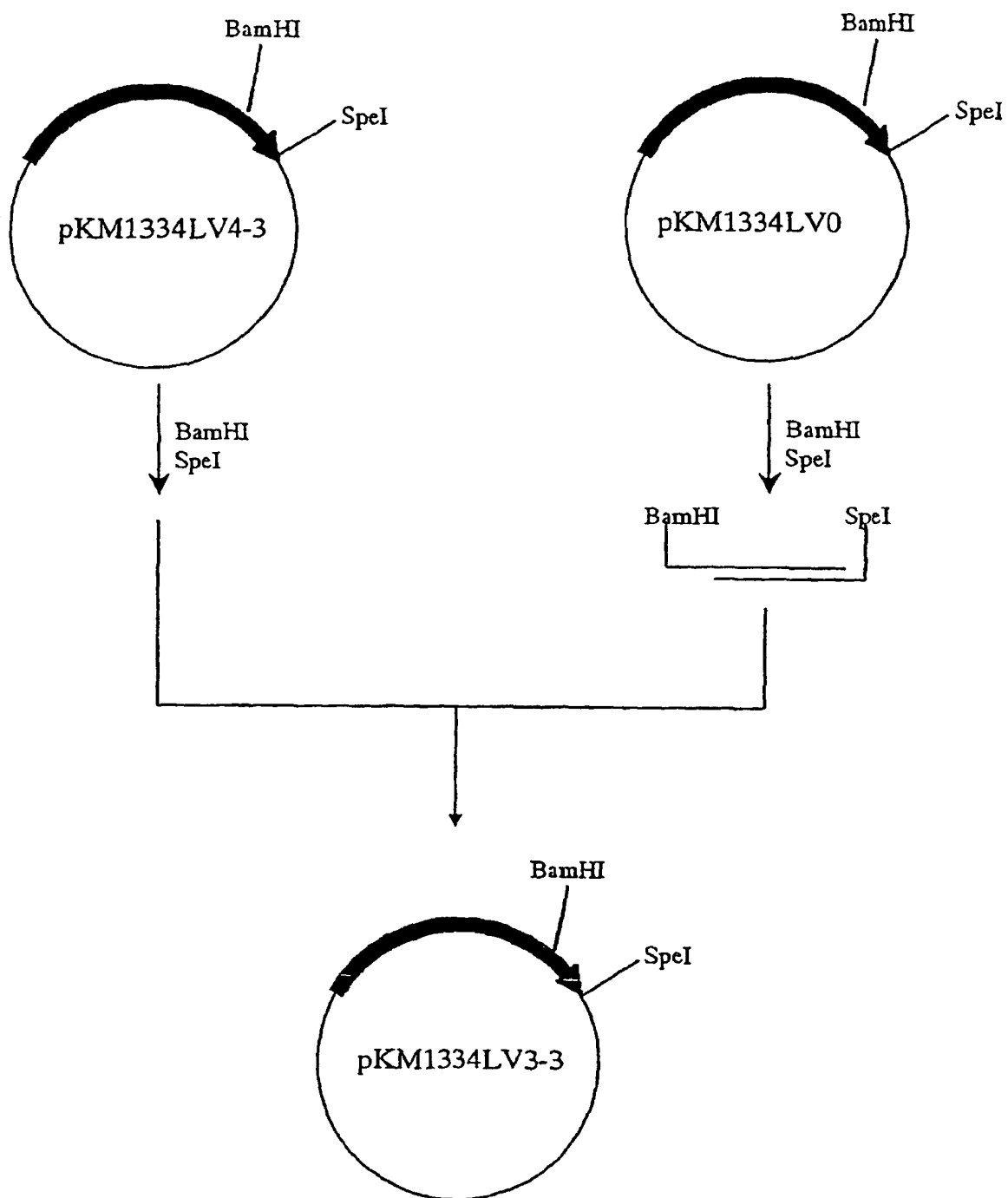


FIG. 15

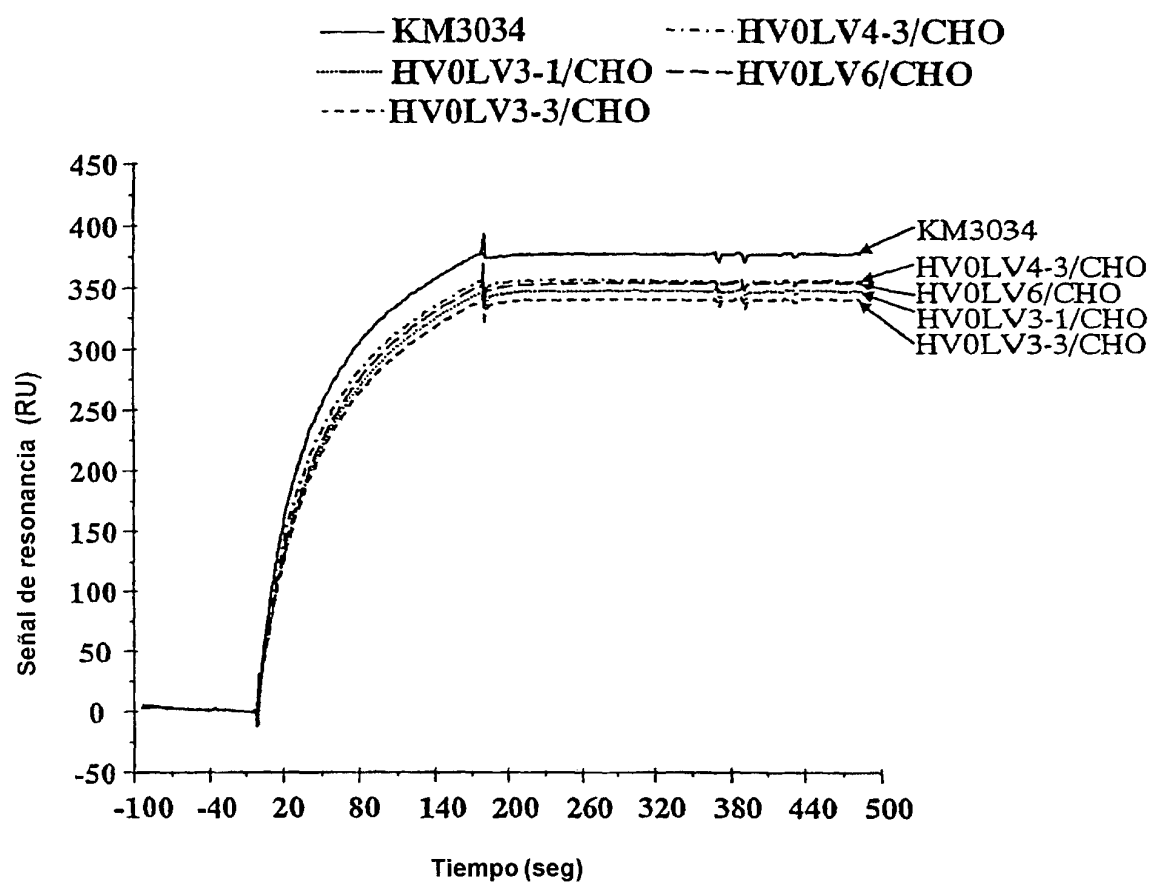
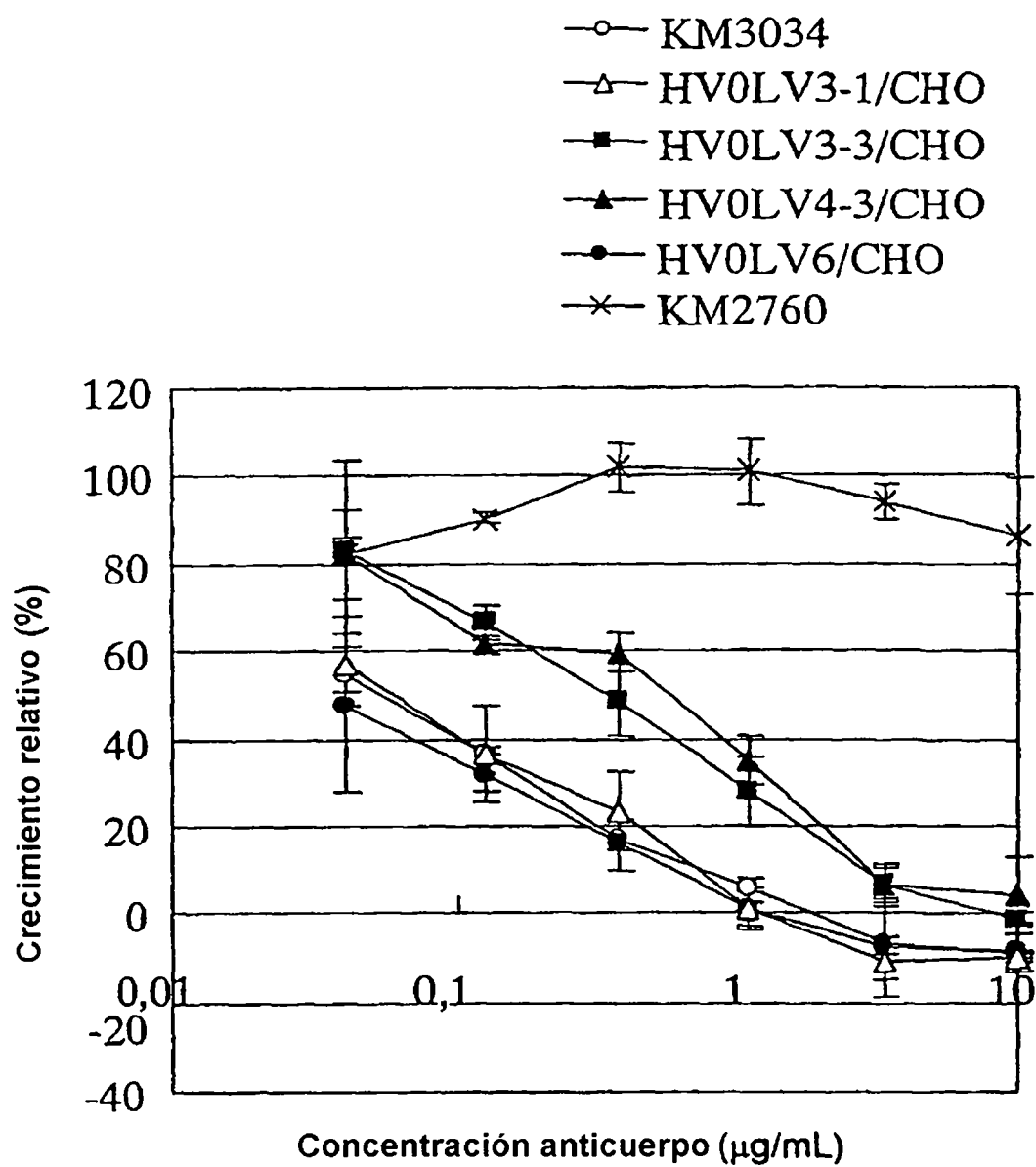


FIG. 16



ES 2 303 859 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

5 <120> Anticuerpo humanizado contra el factor de crecimiento fibroblástico 8 y el fragmento de anticuerpo del mismo

<130> H 3277 EP S3

10 <140> 02743765.6
<141> 2002-06-28

<150> JP2001-196176
15 <151> 2001-06-28

<160> 41

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 420
25 <212> ADN
<213> *Mus musculus*

<220>
30 <221> CDS
<222> (1)..(420)

35 <400> 1

40 atg gaa tgg atc tgg atc ttt ctc ttc ttc ctc tca gga act aca ggt 48
 Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 1 5 10 15

45 gtc tac tcc cag gtt cag ctg cag cag tct gga gct gag gtg gcg agg 96
 Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg
 20 25 30

50

55

60

65

ES 2 303 859 T3

5 ccc ggg gct tca gtg aaa ctg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc 144
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 act gac tac tat cta aac tgg gtg aag cag agg tct gga cag ggc ctt 192
 Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 10 gag tgg att gga gag att gat cct gga agt gat agt ata tat tat aat 240
 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 15 gaa aac ttg gag ggc agg gcc aca ctg act gca gac aaa tcc tcc agc 288
 Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 20 aca gcc tac atg cag ctc aac agc ctg aca tct gag gac tct gca gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 25 tat ttc tgt gca aga tat ggg tat tct aga tac gac gta agg ttt gtc 384
 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
 115 120 125
 30 tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc tct aca 420
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
 130 135 140
 35 <210> 2
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40 <400> 2
 45 Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Phe Leu Ser Gly Thr Thr Gly
 1 5 10 15
 50 Val Tyr Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg
 20 25 30
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 35 40 45
 55 Thr Asp Tyr Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu
 50 55 60
 60 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn
 65 70 75 80
 Glu Asn Leu Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
 85 90 95
 65

ES 2 303 859 T3

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 100 105 110
 5 Tyr Phe Cys Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val
 115 120 125
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
 10 135 140
 <210> 3
 <211> 393
 15 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 <220>
 20 <221> CDS
 <222> (1)..(393)
 25 <400> 3
 atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg ctg atg ttc tgg att cct gct 48
 Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 30 1 5 10 15
 tcc agg agt gat gtt ttg atg acc caa act cca ctc tcc ctg cct gtc 96
 Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 35 20 25 30
 agt ctt gga gat caa gcc tcc atc tct tgc aga tct agt cag agt ctt 144
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 40 35 40 45
 gta cat agt aat gga aga acc tat tta gaa tgg tac ctg cag aaa cct 192
 Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 50 55 60
 ggc cag tca cca aag gtc ctg atc tac aaa gtt tcc aac cga att tct 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
 65 70 75 80
 ggg gtc cca gac agg ttc agt ggc agt gga tca ggg aca gat ttc aca 288
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 50 85 90 95
 ctc aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ctg gga gtt tat ttc tgc 336
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 55 100 105 110
 ttt cag ggt tca cat gtt ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg 384
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 60 115 120 125
 gaa ata aaa 393
 Glu Ile Lys
 65 130

ES 2 303 859 T3

<210> 4

<211> 131

<212> PRT

5 <213> *Mus musculus*

<400> 4

10

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
1 5 10 15

15

Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
20 25 30

20

Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
35 40 45

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

25

Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
65 70 75 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
85 90 95

30

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

35

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys
130

40

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

45 <213> *Mus musculus*

<400> 5

50

Asp Tyr Tyr Leu Asn
1 5

<210> 6

55 <211> 17

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

60

<400> 6

Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu Glu
1 5 10 15

65

Gly

ES 2 303 859 T3

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> *Mus musculus*

 <400> 7
 10 Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr
 1 5 10

 <210> 8
 15 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 20 <400> 8
 Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu
 1 5 10 15

 25 <210> 9
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> *Mus musculus*

 <400> 9
 35 Lys Val Ser Asn Arg Ile Ser
 1 5

 <210> 10
 40 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

 45 <400> 10
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

 50 <210> 11
 <211> 22
 <212> ADN
 55 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 60 <400> 11

 ctgaattcgc ggccgctagt cc
 65 <210> 12
 <211> 39

ES 2 303 859 T3

<212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 12
 10 atgggccctt ggtggaggct gtagagacag tgaccagag 39

<210> 13
 15 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 13
 25 ctgaattcgc ggccgctgct gt 22

<210> 14
 30 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 14
 40 atcgtacgtt ttattccag ctggtcc 28

<210> 15
 45 <211> 25
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50 <400> 21

	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Ser	Ser	Pro	Asn	Phe	Thr	Gln	His	Val	Arg	Glu
55	1				5				10					15		
	Gln	Ser	Leu	Val	Thr	Asp	Gln	Leu	Cys							
				20				25								

60 <210> 16
 <211> 121
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia artificial

ES 2 303 859 T3

<400> 16

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

30

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<400> 17

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

65 <210> 18

<211> 121

ES 2 303 859 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <400> 18

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

35 <210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40

<400> 19

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

<210> 20

ES 2 303 859 T3

<211> 141
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 10 <400> 20

 caggaaacag ctatgacgaa ttgcggccg cacactgact ctaaccatgg aatggatctg 60
 gatctttctc ttcttctctc caggaaactac aggtgtctac tcccaggtgc agctgggtgca 120
 15 gtctggggct gaggtgaaga a 141

 <210> 21
 20 <211> 141
 <212> ADN
 <213>
 25 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 21
 30
 aggatcgatc tctcccatcc actcaagccc ttgtccgggg gctgcccga cccagtttag 60
 atagtagtca gtgaagggtg atccagaagc ctgcaggag accttcactg aggcccccgg 120
 35 ctcttcacc tcagccccag a 141

 <210> 22
 <211> 141
 40 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 45 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético
 <400> 22
 50
 ggatgggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60
 gagtcacgat taccgcggac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120
 gatctgagga cagggccgtg t 141
 55
 <210> 23
 <211> 141
 60 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 65 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

ES 2 303 859 T3

<400> 23

```

5      gttttcccag tcacgactag tgggccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60
      ccctggcccc agtagacaaa cttacgtcg tatctagaat acccatactt cgcacagtaa 120
      tacacggccg tgcctcaga t                                     141

```

<210> 24

10 <211> 141

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

20 <400> 24

```

      caggaaacag ctatgacgaa ttgcggcccg cacactgact ctaaccatgg aatggatctg 60
      gatctttctc ttcttctctt caggaaactac aggtgtctac tcccagggtc agctgggtga 120
25     gtctggggct gaggtggcga g                                     141

```

<210> 25

<211> 141

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 25

```

40     aggatcgatc tctccaatcc actcaagccc ttgtccagac ctctgccgca cccagtttag 60
      atagtagtca gtgaagggtg atccagaagc cttgcaggag accttcaactg aggcccccgg 120
      cctcgccacc tcagccccag a                                     141

```

45 <210> 26

<211> 141

<212> ADN

50 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

55 <400> 26

```

      ggattggaga gatcgatcct ggaagtgata gtatatatta taatgaaaac ttggagggca 60
      gagtcacgat taccgaggac acatccacga gcacagccta catggagctg agcagcctga 120
      gatctgagga cagggccgtg t                                     141

```

<210> 27

65 <211> 141

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 303 859 T3

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

5 <400> 27

```
10      gttttccag tcacgactag tgggcccttg gtggaggctg aggagacggt gaccagggtt 60
      ccctggcccc agtagacaaa cttacgtcg tatctagaat acccatatct cgcacagaaa 120
      tacacggccg tgcctcaga t                                     141
```

15 <210> 28

<211> 130

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

25 <400> 28

```
30      caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctctcaaaa tgaagttgcc tgtaggctg 60
      ttggtgctga tgttctgat tcctgcttcc aggagtata tcgtgatgac tcagtctcca 120
      ctctccctgc                                     130
```

35

<210> 29

<211> 130

<212> ADN

40 <213> Secuencia artificial

<220>

45 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 29

```
50      agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaataggtt cttccattac tatgtacaag 60
      actctgacta gatctgcagg agatggaggc cggctctcca ggggtgacgg gcaggagag 120
      tggagactga                                     130
```

55

<210> 30

<211> 130

60 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

65 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

ES 2 303 859 T3

<400> 30

```

5      tgcagaagcc aggccagtct ccacagctcc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60
      gggctcccaga caggttcagt ggcagtggat cggggacaga ttccacactg aaaatcagca 120
      ggggtggaggc                                     130

```

<210> 31

10 <211> 129

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

20 <400> 31

```

      gttttcccag tcacgactag tcgtacgttt gatttccacc ttggtccctt ggccgaacgt 60
      gtacggaaca tgtgaacct gaaagcagta ataaacccg acgtcctcag cctccacct 120
      gctgatttt                                     129

```

<210> 32

30 <211> 130

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 32

40

```

      caggaaacag ctatgacgaa ttcaggttgc ctcttcaaaa tgaagtggcc tgtaggctg 60
      ttggtgctga tgttctggat tctgcttcc aggagtgatg ttgtgatgac tcagtctcca 120
      ctctcctgc                                     130

```

45

<210> 33

<211> 130

<212> ADN

50

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 33

```

60      agactggcct ggcttctgca ggtaccattc taaataggtt ctccattac tatgtacaag 60
      actctgacta gatctgcagg agatggaggc cggtcttcca agactgacgg gcagggagag 120
      tggagactga                                     130

```

65 <210> 34

<211> 130

<212> ADN

ES 2 303 859 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

<400> 34

10 **tgcagaagcc aggccagtct ccaaaggtcc tgatctataa agtttccaac cgaatttctg 60**
 gggtcccaga caggttcagt ggcagtggat ccgggacaga ttccacactg aaaatcagca 120
 gggtggaggc 130

15 <210> 35
 <211> 129
 <212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

25 <400> 35

30 **gttttcccag tcacgactag tcgtacgttt gatttccacc ttggtccctt ggccgaacgt 60**
 gtacggaaca tgtgaaccct gaaagcagaa ataaaccccg acgtcctcag cctccaccct 120
 gctgatttt 129

35 <210> 36
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

45 <400> 36

 atggtacctg cagaagccag gccagtctcc acagtcct 39

50 <210> 37
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ADN sintético

60 <400> 37

 atggtacctg cagaagccag gccagtctcc acagtcct 39

65 <210> 38
 <211> 112

ES 2 303 859 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <400> 38

```

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

```

30

<210> 39

<211> 112

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<400> 39

40

```

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

```

65 <210> 40

<211> 121

<212> PRT

ES 2 303 859 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 40

```

5      Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Arg Pro Gly Ala
      1          5          10          15

10     Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
      20          25          30

15     Tyr Leu Asn Trp Val Lys Gln Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45

15     Gly Glu Ile Asp Pro Gly Ser Asp Ser Ile Tyr Tyr Asn Glu Asn Leu
      50          55          60

20     Glu Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
      65          70          75          80

25     Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
      85          90          95

25     Ala Arg Tyr Gly Tyr Ser Arg Tyr Asp Val Arg Phe Val Tyr Trp Gly
      100         105         110

30     Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Thr
      115         120

```

<210> 41

<211> 112

35 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 41

```

40     Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Glu
      1          5          10          15

45     Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
      20          25          30

50     Asn Gly Arg Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
      35          40          45

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

55     Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
      65          70          75          80

60     Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Phe Gln Gly
      85          90          95

60     Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
      100         105         110

```

65