

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 905 951**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30	(2006.01) A61P 35/04	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 43/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	
C12N 5/12	(2006.01)	
A61K 51/10	(2006.01)	
A61K 45/06	(2006.01)	
C07K 16/18	(2006.01)	
C07K 16/28	(2006.01)	
A61K 39/00	(2006.01)	
A61K 47/68	(2007.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.11.2006** **E 18185237 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.01.2022** **EP 3421498**

54 Título: **Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento de cáncer**

30 Prioridad:

24.11.2005 EP 05025657

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.04.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
TÜRECI, ÖZLEM;
USENER, DIRK;
FRITZ, STEFAN;
UHEREK, CHRISTOPH;
BRANDENBURG, GUNDA;
GEPPERT, HARALD-GERHARD;
SCHRÖDER, ANJA KRISTINA y
THIEL, PHILIPPE

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 905 951 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento de cáncer

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

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

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

Una posibilidad es que otras proteínas específicas de células epiteliales implicadas en la adhesión célula/célula pueden ser también atractivas para abordajes de anticuerpos, ya que pueden ser apenas accesibles en epitelios bien estructurados a anticuerpos pero se exponen en células tumorales. Por lo tanto, analizamos las proteínas que participan en la organización de la arquitectura del tejido epitelial para su idoneidad como dianas para los anticuerpos terapéuticos. Una proteína que llamó particularmente nuestra atención es la claudina 18.

La molécula de claudina 18 (CLD18) (Número de registro de Genbank: variante de empalme 1 (CLD18A1): NP_057453, NM_016369 y variante de empalme 2 (CLD18A2): NM_001002026, NP_001002026) es una proteína transmembrana integral con un peso molecular de aproximadamente 27.9/27.72 kD. Las claudinas son proteínas integrales de membrana situadas dentro de las uniones estrechas de epitelios y endotelios. Las uniones estrechas organizan una red de hebras interconectadas de partículas intramembranas entre células adyacentes. En las uniones estrechas, la ocludina y las claudinas son los componentes más prominentes de la proteína transmembrana. Debido a sus fuertes propiedades de adhesión intercelular, crean una barrera primaria para prevenir y controlar el transporte paracelular de solutos y restringir la difusión lateral de los lípidos y proteínas de la membrana para mantener la polaridad celular. Las proteínas que forman la unión estrecha están implicadas críticamente en la organización de la arquitectura del tejido epitelial. Asumimos que tales proteínas pueden ser apenas accesibles a los anticuerpos en epitelios bien estructurados pero se exponen en las células tumorales. El documento WO2004/047863 describe diversos tumores que expresan las variantes de empalme de CLD18 de una manera específica del tumor. Además, el documento WO2004/047863 describe anticuerpos que pueden usarse para diagnosticar estos tumores.

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

2 y topología CLD18-3 albergan un sitio adicional de N-glicosilación extracelular.

Otro nivel de complejidad se añade a la molécula CLD18 por la presencia de dos variantes de empalme diferentes, que están descritas en ratón y en humanos (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001). Las variantes de empalme CLD18A1 y CLD18A2 difieren en los primeros 21 aminoácidos N-terminales, que comprenden la primera TM y bucle 1, mientras que la secuencia de proteína primaria de la C-terminal es idéntica.

El CLD18A1 se expresa selectivamente en epitelios pulmonares y de estómago normales, mientras que CLD18A2 se expresa únicamente en células gástricas (Niimi, Mol. Cell. Biol. 21: 7380-90, 2001). Lo más importante, CLD18A2 está restringido a las células de vida corta diferenciadas del epitelio del estómago pero está desprovisto de la región de las células madre gástricas. Usando PCR-RT sensible, hemos demostrado que ambas variantes no son detectables en absoluto en cualquier otro órgano humano normal, pero se expresan de forma robusta en varios tipos de cáncer incluyendo tumores de estómago, esofágico, pancreático y de pulmón, así como líneas celulares de cáncer humano. La expresión es más prominente en los subtipos de adenocarcinoma de estas indicaciones.

El peso molecular de la proteína difiere en algunos cánceres y tejido adyacente normal. La proteína de mayor peso molecular observada en tejido sano puede transferirse al mismo peso molecular que se observa en cáncer tratando lisados de tejido con el compuesto desglucosilante PNGasa F. Esto sugiere que CLD18 es menos N-glicosilado en cáncer en comparación con su tejido normal contrapartida. Es probable que esta diferencia estructural dé lugar a un epítipo alterado. Un motivo clásico de N-glicosilación está en la posición aa 116 dentro del dominio bucle D3 de la molécula.

Los términos "CLD18" y "variante CLD18" de acuerdo con la enseñanza comprenderán (i) variantes de empalme de CLD18, (ii) variantes de CLD18-N-glicosilación, (iii) variantes de conformación CLD18, (iv) CLD18 libre y homotípicamente/heterotípicamente asociado a las variantes localizadas en las uniones estrechas intercelulares y (v) CLD18 relacionados con el cáncer y CLD18 no relacionados con las células de las variantes relacionadas.

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

El objeto de la enseñanza es proporcionar anticuerpos útiles para la terapia de enfermedades en las que se expresa CLD18, tales como enfermedades tumorales. Los anticuerpos descritos en el presente documento también tienen utilidad para diagnosticar tales enfermedades.

Resumen

La presente enseñanza generalmente proporciona anticuerpos útiles como agentes terapéuticos para tratar y/o prevenir enfermedades asociadas con células que expresan CLD18, incluyendo enfermedades relacionadas con tumores tales como cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cuello - cabeza y cáncer de la vesícula biliar.

En un aspecto, la enseñanza se refiere a un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLD18 y mediar la muerte de células que expresan CLD18. Preferiblemente, el anticuerpo se une a CLD18A1 y CLD18A2 y más preferiblemente se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1. Preferiblemente, los anticuerpos de la divulgación se unen a y son específicos para bucle1 o bucle 2 de CLD18-Conformación-1. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo de la enseñanza se une y es específico para el bucle D3 de CLD conformación-2 y, en particular, se une a o alrededor de un potencial sitio de N-glicosilación en la posición 116 dentro de bucle D3. En realizaciones adicionales, el anticuerpo de la enseñanza es específico para la forma no glicosilada del potencial sitio de N-glicosilación en la posición 116 dentro del bucle D3.

La muerte de células por el anticuerpo de la enseñanza se induce preferiblemente mediante la unión del anticuerpo a CLD18 expresado por dichas células, más preferiblemente por unión del anticuerpo a CLD18A2 expresado por dichas células. En una realización, la unión del anticuerpo de la enseñanza a CLD18A1 expresada por dichas células no induce la muerte de dichas células.

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

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

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

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

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

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

- 15 En realizaciones particularmente preferidas, el anticuerpo de la enseñanza se une a epítomos nativos de CLD18 presentes en la superficie de células vivas. En otras realizaciones preferidas, el anticuerpo de la enseñanza es específico para células cancerosas, preferiblemente células de cáncer de estómago.

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

- 20 Los anticuerpos de la enseñanza pueden obtenerse mediante un método que comprende la etapa de inmunizar un animal con una proteína o péptido que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20, 21-23 y 26-31, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico o célula huésped que expresa dicha proteína o péptido, o fragmento inmunogénico del mismo. Preferiblemente, un anticuerpo de la enseñanza es específico para las proteínas mencionadas anteriormente, péptidos o fragmentos inmunogénicos de las mismas.

- 25 En una realización particularmente preferida, el anticuerpo de la enseñanza es producido por un clon que tiene el número de acceso DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294), o DSM ACC2810 (182-D1106-362).

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

- 35 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un hibridoma capaz de producir el anticuerpo de la divulgación. Hibridomas preferidos son aquellos que tienen el número de acceso DSM ACC2737 (182-D1106-055), DSM ACC2738 (182-D1106-056), DSM ACC2739 (182-D1106-057), DSM ACC2740 (182-D1106-058), DSM ACC2741 (182-D1106-059), DSM ACC2742 (182-D1106-062), DSM ACC2743 (182-D1106-067), DSM ACC2745 (182-D758-035), DSM ACC2746 (182-D758-036), DSM ACC2747 (182-D758-040), DSM ACC2748 (182-D1106-061), DSM ACC2808 (182-D1106-279), DSM ACC2809 (182-D1106-294), o DSM ACC2810 (182-D1106-362).

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

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

- 45 En un aspecto adicional, la enseñanza se refiere a un método para inhibir el crecimiento y/o la muerte de una célula que expresa CLD18, preferiblemente CLD18A2, que comprende poner en contacto la célula con una cantidad eficaz de un anticuerpo de la divulgación y/o un conjugado de la misma con un agente terapéutico. CLD18 se expresa preferentemente en la superficie de dicha célula.

- 50 En un aspecto adicional la enseñanza se refiere a un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que implica células que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, que comprende administrar a un sujeto un anticuerpo de la enseñanza, un conjugado del mismo con un agente terapéutico o una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la enseñanza o su conjugado con un agente terapéutico. Preferiblemente, la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con el tumor y en determinadas realizaciones se selecciona del grupo que consiste en cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de la vesícula biliar. CLD18A2 se expresa preferentemente en la superficie de dichas células.

Preferiblemente, los anticuerpos de la enseñanza tienen la capacidad de discriminar variantes de CLD18 expresadas por diferentes tipos celulares incluyendo células cancerosas y células no malignas. En una realización particularmente preferida, los anticuerpos de la enseñanza tienen la capacidad de unirse a CLD18A2 mientras que no se unen a CLD18A1, se unen a CLD18A1 con una especificidad inferior en comparación con la especificidad de unión a CLD18A2.

El término "unión" de acuerdo con la enseñanza se refiere preferiblemente a una unión específica. "Enlace específico" significa que un agente tal como un anticuerpo se une más fuertemente a un objetivo tal como un epítipo para el cual es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se une más fuerte a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_D) que es menor que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferiblemente, la constante de disociación (K_D) para el objetivo al que se une específicamente el agente es más de 10 veces, preferiblemente más de 20 veces, más preferiblemente más de 50 veces, incluso más preferiblemente más de 100 veces, 200 veces, 500 veces o 1000 veces menor que la constante de disociación (K_D) para el objetivo al que el agente no se une específicamente.

Los anticuerpos de la enseñanza median la muerte de células que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, por unión a CLD18, expresadas preferiblemente en la superficie de dichas células. En una realización, los anticuerpos de la enseñanza inducen citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por al menos aproximadamente 20-40% de lisis mediada por CDC, preferiblemente aproximadamente 40-50% de lisis mediada por CDC, y más preferiblemente más de 50% de lisis mediada por CDC de células que expresan CLD18. Tales anticuerpos se ejemplifican aquí por los siguientes anticuerpos: 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 163E12, 175D10, 45C1, 125E1, ch-163E12 y ch-175D10. Alternativamente o además de inducir CDC, los anticuerpos de la enseñanza pueden inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de células que expresan CLD18 en presencia de células efectoras (por ejemplo, monocitos, células mononucleares, células NK y PMN). Tales anticuerpos se ejemplifican aquí por los siguientes anticuerpos: 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 61C2, 26B5, 26D12, 28D10, 42E12, 163E12, 175D10, 45C1 y 125E1. Los anticuerpos de la enseñanza pueden tener la capacidad de inducir la apoptosis de células que expresan CLD18, inducir la adhesión homotípica de células que expresan CLD18 y/o inducir fagocitosis de células que expresan CLD18 en presencia de macrófagos. Los anticuerpos de la enseñanza pueden tener una o más de las propiedades funcionales descritas anteriormente. Preferiblemente, los anticuerpos de la enseñanza inducen la lisis mediada por CDC y la lisis mediada por ADCC de células que expresan CLD18 y más preferiblemente inducen la lisis mediada por ADCC de células que expresan CLD18 mientras que no inducen la lisis mediada por CDC de dichas células. Células diana de ejemplo para anticuerpos de la presente enseñanza incluyen, pero no se limitan a, células de cáncer que expresan CLD18, preferiblemente CLD18A2, tales como células tumorigénicas gástricas, pancreáticas, esofágicas y de cáncer de pulmón. En una realización preferida particular, el sacrificio de células mediadas por anticuerpos de la enseñanza es CLD18A2 específico, es decir, anticuerpos de la enseñanza de mediación de la muerte de células, preferiblemente CDC y/o ADCC mediada por lisis de células, expresando CLD18A2, pero no median la muerte de células que expresan CLD18A1 pero sin expresar CLD18A2. Los anticuerpos descritos anteriormente pueden usarse para mediar la muerte de células tumorales en el tratamiento o prevención de cáncer tales como cáncer gástrico, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer hepático, cáncer de cuello - cabeza y cáncer de la vesícula biliar.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden clasificarse en clases distintas de acuerdo con sus propiedades de unión y su capacidad para mediar la función efectora en las células que expresan CLD18. Los anticuerpos de la enseñanza pueden clasificarse según sus

- propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células que expresan CLD18A1 o CLD18A2 (discriminación de variantes de empalme de CLD18),
- propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células que expresan variantes de CLD18 glicosiladas o no glicosiladas (discriminación entre variantes de CLD18 con y sin N-glicosilación),
- propiedades de unión y/o funciones efectoras mediadas en células cancerosas o tipos celulares normales (discriminación entre variantes CLD18 expresadas por células tumorales o células normales no malignas),
- propiedades de unión a los epítopos CLD18 enmascarados por la formación de uniones estrechas,
- capacidad para inducir la formación de agregados de CLD 18 en células vivas, y
- capacidad para unirse a una variante de CLD18 no humana, particularmente variantes de CLD18 de ratones, ratas, conejos y primates.

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

a) unión a CLD18A2 así como a CLD18A1 (por ejemplo, 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 61C2 y 41C6)

b) unión a CLD18A2 pero no a CLD18A1 (por ejemplo 26B5, 37G11, 38G5, 42E12 y 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10, ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2, ch-175D10)

5 c) unión a CLD18 expresado naturalmente por células tumorales pero no a CLD 18 expresado naturalmente por células o tejidos no cancerosos tales como células de estómago y pulmón (por ejemplo 26B5, 75B8, 24H5, 39F11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10).

d) mediar la muerte de células inducida por CDC, que expresan CLD18A2 pero no de células que expresan CLD18A1 (por ejemplo, 26D12, 28D10, 37H8 y 39F11, 163E12, ch-125E1, ch-163E12, ch-175D10)

e) mediar la muerte inducida por ADCC de células que expresan CLD18 (por ejemplo, 26B5, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 43A11, 47D12 y 61C2, ch-163E12, ch-175D10)

10 f) mediar la muerte inducida por ADCC pero no la muerte mediada por CDC de células que expresan CLD18 (por ejemplo, 37G11, 42E12 y 43A11)

g) mediar la muerte inducida por ADCC y la muerte inducida por CDC de células que expresan CLD18A2 (por ejemplo, 37H8, 38H3, 39F11, ch-163E12, ch-175D10).

Como se ejemplifica en este documento, los anticuerpos de la enseñanza abarcan además moléculas, que

15 a) se unen a células diferenciadas del estómago normal, pero no a las células madre del estómago (por ejemplo, 39F11)

b) no se unen al tejido gástrico normal, así como a otros órganos normales, sino exclusivamente a las células cancerosas (por ejemplo 26B5)

c) se unen a un epítipo que abarca una Asn no glicosilada en la posición 116 de CLD18

20 d) que se unen a CLD18 humano así como a ratón, permitiendo realizar exhaustivamente estudios de toxicidad preclínica en ratones.

Los anticuerpos de la enseñanza pueden derivarse de diferentes especies, incluyendo pero no limitándose a ratón, rata, conejo, cobayas y humanos. Los anticuerpos de la enseñanza también incluyen moléculas quiméricas en las que una región constante de anticuerpo derivada de una especie, preferiblemente humana, se combina con el sitio de unión a antígeno derivado de otra especie. Además, los anticuerpos de la enseñanza incluyen moléculas humanizadas en las que los sitios de unión a antígenos de un anticuerpo derivado de una especie no humana se combinan con regiones constantes y de armazón de origen humano.

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

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

En realizaciones preferidas, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden caracterizarse por una o más de las siguientes propiedades:

45 a) especificidad para CLD18, en particular especificidad para CLD18A2;

b) una afinidad de unión a CLD18, en particular CLD18A2, de aproximadamente 100 nM o menos, preferiblemente de aproximadamente 5-10 nM o menos y, más preferiblemente, de aproximadamente 1-3 nM o menos,

c) la capacidad para mediar un alto nivel de CDC en células CD55/59 negativas o CD55/59 positivas;

d) la capacidad para inhibir el crecimiento de células que expresan CLD18;

50 e) la capacidad para inducir la apoptosis de células que expresan CLD18;

- f) la capacidad para inducir la adhesión homotípica de células que expresan CLD18;
- g) la capacidad para inducir ADCC de células que expresan CLD 18 en presencia de células efectoras;
- h) la capacidad de prolongar la supervivencia de un sujeto que tiene células tumorales que expresan CLD18;
- i) la capacidad de agotar células que expresan CLD18;
- 5 j) la capacidad de agotar células que expresan niveles bajos de CLD18 y/o
- k) la capacidad de agregar CLD18 sobre la superficie de células vivas

Los anticuerpos anti-CLD 18 de la presente enseñanza pueden derivarse, unirse o coexpresarse a otras especificidades de unión. En una realización particular, la enseñanza proporciona una molécula biespecífica o multiespecífica que comprende al menos una primera especificidad de unión para CLD18 (por ejemplo, un anticuerpo anti-CLD18 o mimético de la misma) y una segunda especificidad de unión para una célula efectora, tal como una especificidad de unión para un receptor Fc (por ejemplo, un receptor Fc-gamma, tal como Fcgamma RI, o cualquier otro receptor Fc) o un receptor de células T, por ejemplo, CD3.

Por consiguiente, la presente enseñanza incluye moléculas biespecíficas y multiespecíficas que se unen tanto a CLD18 como a un receptor Fc o un receptor de células T, por ejemplo CD3. Ejemplos de receptores Fc son el receptor IgG, el receptor Fc-gamma (Fc γ R), tal como Fc γ RI (CDC64), Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). También pueden dirigirse otros receptores Fc, tales como receptores IgA (por ejemplo, Fc α RI). El receptor Fc está situado preferiblemente en la superficie de una célula efectora, por ejemplo, un monocito, un macrófago o una célula mononuclear activada. En una realización preferida, las moléculas biespecíficas y multiespecíficas se unen a un receptor Fc en un sitio que es distinto del sitio de unión de inmunoglobulina Fc (por ejemplo, IgG o IgA) del receptor. Por lo tanto, la unión de las moléculas biespecíficas y multiespecíficas no está bloqueada por los niveles fisiológicos de las inmunoglobulinas.

En aún otro aspecto, los anticuerpos anti-CLD18 de la enseñanza se derivan, se ligan o se coexpresan con otra molécula funcional, por ejemplo, otro péptido o proteína (por ejemplo, un fragmento Fab'). Por ejemplo, un anticuerpo de la enseñanza puede estar funcionalmente unido (por ejemplo, por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro modo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, para producir un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), una citotoxina, ligando celular o antígeno (por ejemplo, para producir un inmunoconjugado, tal como una inmunotoxina). Un anticuerpo de la presente enseñanza puede estar enlazado a otros restos terapéuticos, por ejemplo, un radioisótopo, un fármaco anticanceroso de molécula pequeña, una citoquina recombinante o quimioquina. Por consiguiente, la presente enseñanza abarca una gran variedad de conjugados de anticuerpo, moléculas biespecíficas y multiespecíficas, y proteínas de fusión, todas las cuales se unen a células que expresan CLD18 y que pueden usarse para dirigir otras moléculas a dichas células.

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

La presente enseñanza también incluye la administración simultánea o secuencial de dos o más anticuerpos anti-CLD18 de la enseñanza, en donde al menos uno de dichos anticuerpos es un anticuerpo anti-CLD18 quimérico y al menos un anticuerpo adicional es un anticuerpo anti-CLD18, los anticuerpos se unen a los mismos o diferentes epítomos de CLD18. Preferiblemente, se administra un anticuerpo CLD18 quimérico de la enseñanza enseñanza primero seguido por la administración de un anticuerpo anti-CLD18 humano de la enseñanza, en donde el anticuerpo anti-CLD18 humano se administra preferiblemente durante un período prolongado de tiempo, es decir, como tratamiento de mantenimiento.

Los anticuerpos, inmunoconjugados, moléculas biespecíficas y multiespecíficas y composiciones de la presente enseñanza pueden usarse en una variedad de métodos para inhibir el crecimiento de células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 y/o matar selectivamente células que expresan CLD18, en particular CLD18A2 poniendo en contacto las células con una cantidad eficaz del anticuerpo, inmunoconjugado, molécula biespecífica/multiespecífica o composición, de tal manera que se inhiba el crecimiento de la célula y/o se mata la célula. En una realización, el método incluye la muerte de la célula que expresa CLD18, opcionalmente en presencia de células efectoras, por ejemplo, por CDC, apoptosis, ADCC, fagocitosis, o por una combinación de dos o más de estos mecanismos. Las células que expresan CLD18 que se pueden inhibir o matar utilizando los anticuerpos de la enseñanza incluyen células

cancerosas tales como células tumorigénicas de estómago, páncreas, esófago, pulmón, ovario, colon, hepático, cabeza - cuello y vesícula biliar.

Por consiguiente, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden usarse para tratar y/o prevenir una variedad de enfermedades que implican células que expresan CLD18 administrando los anticuerpos a pacientes que sufren de tales enfermedades. Las enfermedades ejemplares que pueden ser tratadas (por ejemplo, mejoradas) o prevenidas incluyen, pero no se limitan a, enfermedades tumorigénicas. Ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse incluyen cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer esofágico, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello y cáncer de la vesícula biliar.

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

En aún otro aspecto, la enseñanza se refiere a una estrategia de inmunización para inmunizar animales no humanos tales como ratones con CLD18 humano o un fragmento peptídico del mismo, preferiblemente CLD18A2 o un fragmento peptídico del mismo para obtener anticuerpos. Los péptidos preferidos para la inmunización son los seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23 y 26-31. Por consiguiente, en las realizaciones preferidas, los anticuerpos de la enseñanza son los obtenidos por inmunización usando péptidos seleccionados del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 4, 6, 16, 18, 20-23 y 26-31. Análogamente, pueden generarse anticuerpos contra CLD18 en un animal transgénico no humano, tal como un ratón transgénico. El animal no humano transgénico puede ser un ratón transgénico que tiene un genoma que comprende un transgén de cadena pesada y un transgén de cadena ligera que codifica la totalidad o una parte de un anticuerpo.

Animales de tipo salvaje, así como animales no humanos transgénicos, pueden inmunizarse con una preparación purificada o enriquecida de antígeno CLD18 y/o ácidos nucleicos y/o células que expresan CLD18 o un fragmento peptídico del mismo. Preferiblemente, el animal no humano es capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos a CLD18 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgM) sometándose a recombinación V-D-J y conmutación de isotipo. La conmutación de isotipo puede ocurrir por ejemplo, conmutación de isotipo clásica o no clásica.

En consecuencia, en aún otro aspecto, la enseñanza proporciona células B aisladas a partir de un animal no humano como se ha descrito anteriormente. Las células B aisladas pueden ser entonces inmortalizadas por fusión a una célula inmortalizada para proporcionar una fuente (por ejemplo, un hibridoma) de anticuerpos de la enseñanza. Tales hibridomas (es decir, que producen anticuerpos de la enseñanza) también se incluyen dentro del alcance de la enseñanza.

Como se ejemplifica aquí, los anticuerpos de la enseñanza pueden obtenerse directamente de hibridomas que expresan el anticuerpo, o pueden ser clonados y expresados de forma recombinante en una célula huésped (por ejemplo, una célula CHO o una célula linfocítica). Otros ejemplos de células huésped son microorganismos, tales como E. coli, y hongos, tales como levadura. Alternativamente, pueden producirse recombinantemente en un animal o planta transgénico no humano.

Las células de hibridoma preferido para producir anticuerpos de la enseñanza son las secuenciadas o depositadas en la DSMZ (Mascheroder Weg 1b, 31824 Braunschweig, Alemania, nueva dirección: Inhoffenstr.7B, 31824 Braunschweig, Alemania) que tiene las siguientes designaciones y números de acceso:

a. 182-D1106-055, No. de acceso DSM ACC2737, depositado el 19 de octubre de 2005

b. 182-D1106-056, No. de acceso DSM ACC2738, depositado el 19 de octubre de 2005

c. 182-D1106-057, No. de acceso DSM ACC2739, depositado el 19 de octubre de 2005

d. 182-D1106-058, No. de acceso DSM ACC2740, depositado el 19 de octubre de 2005

e. 182-D1106-059, No. de acceso DSM ACC2741, depositado el 19 de octubre de 2005

f. 182-D1106-062, No. de acceso DSM ACC2742, depositado el 19 de octubre de 2005,

g. 182-D1106-067, No. de acceso DSM ACC2743, depositado el 19 de octubre de 2005

h. 182-D758-035, No. de acceso DSM ACC2745, depositado el 17 de noviembre de 2005

i. 182-D758-036, No. de acceso DSM ACC2746, depositado el 17 de noviembre de 2005

j. 182-D758-040, No. de acceso DSM ACC2747, depositado el 17 de noviembre de 2005

k. 182-D1106-061, No. de acceso DSM ACC2748, depositado el 17 de noviembre de 2005

l. 182-D1106-279, No. de acceso DSM ACC2808, depositado el 26 de octubre de 2006

m. 182-D1106-294, No. de acceso DSM ACC2809, depositado el 26 de octubre de 2006,

n. 182-D1106-362, No. de acceso DSM ACC2810, depositado el 26 de octubre de 2006.

- 5 Los anticuerpos preferidos de la enseñanza son los producidos por y obtenibles a partir de los hibridomas anteriormente descritos; es decir 37G11 en el caso de 182-D1106-055, 37H8 en el caso de 182-D1106-056, 38G5 en el caso de 182-D1106-057, 38H3 en el caso de 182-D1106-058, 39F11 en el caso de 182-D1106-059, 43A11 en el caso de 182-D1106-062, 61C2 en el caso de 182-D1106-067, 26B5 en el caso de 182-D758-O35, 26D12 en el caso de 182-D758-28D10 en el caso de 182-D758-040, 42E12 en el caso de 182-D1106-061, 125E1 en el caso de 182-D1106-279, 163E12 en el caso de 182-D1106-294 y 175D10 en el caso de 182-D1106-362; y sus formas quimerizada y humanizada.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

"Fragmento" o "fragmento de una secuencia de aminoácidos" como se ha utilizado anteriormente se refiere a una parte de una secuencia de anticuerpos, es decir, una secuencia que representa la secuencia de anticuerpos acortada en el extremo N- y/o C- terminal, que cuando reemplaza dicha secuencia de anticuerpos en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferiblemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en el presente documento, por ejemplo lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC. Preferiblemente, un fragmento de una secuencia de aminoácidos comprende al menos 80%, preferiblemente al menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de los residuos de aminoácidos de dicha secuencia de aminoácidos. Un fragmento de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128 y 129 se refiere preferiblemente a dicha secuencia en la que se eliminan 17, 18, 19, 20, 21, 22 o 23 aminoácidos en el extremo N-terminal. Los fragmentos de las secuencias de aminoácidos descritas aquí pueden codificarse por fragmentos respectivos de secuencias de ácido nucleico que codifican dichas secuencias de aminoácidos.

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

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

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

En una realización preferida, un anticuerpo de la enseñanza comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 138, 139, 140, 141,

142, 143, 144, 145, 146, y un fragmento del mismo.

En ciertas realizaciones preferidas, un anticuerpo de la enseñanza comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) seleccionada de las siguientes posibilidades (i) a (ix):

- 5 (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 132 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 139 o un fragmento de la misma,
- (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 133 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 138 o un fragmento de la misma,
- (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 134 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 140 o un fragmento de la misma,
- 10 (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 136 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 143 o un fragmento de la misma,
- (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 142 o un fragmento de la misma,
- 15 (vi) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 141 o un fragmento de la misma,
- (vii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 o un fragmento de la misma,
- 20 (viii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 145 o un fragmento de la misma,
- (ix) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146 o un fragmento de la misma.

Una VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 132 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 55. Un VH que
25 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 133 puede ser codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 56. Un VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 134 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 57. Un VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 136 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la
30 secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 59. Un VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 135 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por (SEQ ID NO: 58). Un VH que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 137 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 60.

Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 139 puede ser codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 62. Una VL que
35 comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 138 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 61. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 140 puede ser codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 63. Un VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 143 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la
40 secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 66. Un VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 142 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 65. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 141 puede ser codificada por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representan Ed. Por SEQ ID NO: 64. Un VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 144 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por
45 SEQ ID NO: 67. Un VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada Por SEQ ID NO: 145 puede ser codificado por un ácido nucleico que comprende la secuencia de ácido nucleico representada por SEQ ID NO: 68. Una VL que comprende una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 146 puede ser codificada por
50 un ácido nucleico que comprende el nucleico Secuencia de ácido representada por SEQ ID NO: 69.

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

- (i) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de SEQ ID NO: 115,
- (ii) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 116,
- 5 (iii) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de SEQ ID NO: 117,
- (iv) CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 118, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 118, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 118,
- 10 (v) CDR1: posiciones 44-51 de SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de SEQ ID NO: 119, y
- (vi) CDR1: posiciones 45-53 de SEQ ID NO: 120, CDR2: posiciones 71-78 de SEQ ID NO: 120, CDR3: posiciones 117-128 de SEQ ID NO: 120,
- En una realización preferida, un anticuerpo de la enseñanza comprende un VL que comprende un conjunto de regiones CDR1, CDR2 y CDR3 determinantes de complementariedad seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (ix):
- 15 (i) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 121,
- (ii) CDR1: posiciones 49-53 de SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de SEQ ID NO: 122,
- 20 (iii) CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 123,
- (iv) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 124, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 124, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 124,
- (v) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 125, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 125, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 125,
- 25 (vi) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de SEQ ID NO: 126,
- (vii) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 127, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 127, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 127,
- 30 (viii) CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 128, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 128, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 128,
- (ix) CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 129, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 129, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 129,
- En una realización preferida, un anticuerpo de la enseñanza comprende una combinación de VH y VL, cada una de las cuales comprende un conjunto de regiones CDR1, CDR2 y CDR3 que determinan la complementariedad, seleccionadas de las siguientes realizaciones (i) a (ix):
- 35 (i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de SEQ ID NO: 115, VL: CDR1: posiciones 49-53 de SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de SEQ ID NO: 122,
- 40 (ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de SEQ ID NO: 116, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de SEQ ID NO: 121,
- (iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de SEQ ID NO: 117, VL: CDR1: posiciones 47-52 de SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de SEQ ID NO: 123,
- 45 (iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de SEQ ID NO: 119, VL: CDR1: posiciones 47-58 de SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de SEQ ID NO: 126,

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

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

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

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

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

20 En realizaciones preferidas adicionales, un anticuerpo de la enseñanza comprende preferiblemente una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18, preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 descrito en el presente documento, y preferiblemente
25 comprende una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR), preferiblemente al menos la región variable CDR3, de las regiones variables de cadena pesada VH y/o regiones variables de cadena ligera (VL) descritas en el presente documento. En una realización, dicha una o más de las regiones de determinación de complementariedad (CDR) se seleccionan de un conjunto de regiones CDR1, CDR2 y CDR3 determinantes de la
30 complementariedad descritas en el presente documento. En una realización particularmente preferida, un anticuerpo de la enseñanza comprende preferiblemente las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 determinantes de la complementariedad de la región variable de cadena pesada (VH) y/o de la región variable de cadena ligera (VL) de un anticuerpo monoclonal contra CLD18, preferiblemente de un anticuerpo monoclonal contra CLD18 descrito en el presente documento, y preferiblemente comprende las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 determinantes de la complementariedad de las regiones variables (VH) y/o regiones variables de cadena ligera (VL) de cadena pesada
35 descritas en el presente documento.

40 En una realización un anticuerpo de la enseñanza que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe aquí comprende dichas CDR junto con sus regiones estructurales intermedias. Preferiblemente, la porción también incluirá al menos aproximadamente el 50% de una o ambas regiones de la primera y cuarta estructura, siendo el 50% el 50% C-terminal de la primera región estructural y el 50% N-terminal de la cuarta región marco. La construcción de anticuerpos de la presente enseñanza realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N- o C- terminales en las regiones variables codificadas por los enlazadores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación, incluyendo la introducción de conectores para unir regiones variables de la enseñanza a secuencias de proteínas adicionales incluyendo cadenas pesadas de inmunoglobulina, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de
45 diacuerpos) o etiquetas de proteínas.

En una realización, un anticuerpo de la enseñanza que comprende una o más CDR, un conjunto de CDR o una combinación de conjuntos de CDR como se describe aquí comprende dichas CDR en una estructura de anticuerpo humano.

45 La referencia en este documento a un anticuerpo que comprende con respecto a su cadena pesada una cadena particular o una región o secuencia particular se refiere preferiblemente a la situación en la que todas las cadenas pesadas de dicho anticuerpo comprenden dicha cadena, región o secuencia particular. Esto se aplica correspondientemente a la cadena ligera de un anticuerpo.

50 La presente enseñanza se refiere también a ácidos nucleicos que comprenden genes o secuencias de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos o partes de los mismos, por ejemplo, una cadena de anticuerpos, como se describe en el presente documento. Los ácidos nucleicos pueden estar comprendidos en un vector, por ejemplo, un plásmido, cósmido, virus, bacteriófago u otro vector utilizado por ejemplo convencionalmente en ingeniería genética. El vector puede comprender genes adicionales tales como genes marcadores que permitan la selección del vector en una célula huésped adecuada y bajo condiciones adecuadas. Además, el vector puede comprender elementos de control de expresión que permitan la expresión apropiada de las regiones codificantes en huéspedes adecuados. Tales
55 elementos de control son conocidos por el experto en la técnica y pueden incluir un promotor, un casete de empalme y un codón de iniciación de la traducción.

Preferiblemente, el ácido nucleico de la enseñanza está unido operativamente a las secuencias de control de expresión anteriores que permiten la expresión en células eucariotas o procariotas. Los elementos de control que aseguran la

expresión en células eucariotas o procariotas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

Los métodos para la construcción de moléculas de ácido nucleico de acuerdo con la presente enseñanza, para la construcción de vectores que comprenden las moléculas de ácido nucleico anteriores, para la introducción de los vectores en células huésped apropiadamente elegidas, para causar o lograr la expresión, son bien conocidos en el arte.

Un aspecto adicional de la presente enseñanza también se refiere a una célula huésped que comprende un ácido nucleico o un vector como se divulga en el presente documento.

Otras características y ventajas de la presente enseñanza serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un análisis por inmunofluorescencia de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 acoplado a un fluorocromo verde y hecho reaccionar con suero de ratón después de la inmunización de ADN con SEQ ID NO: 15 fusionado a un epítipo auxiliar.

La figura 2 muestra un análisis de inmunotransferencia Western de células HEK293 transfectadas con CLD18A2-myc (SEQ ID NO: 3) y células HEK293 no transfectadas con el anticuerpo monoclonal 9E11 de ratón-anti-c-myc (Serotec, CRL MCA2200).

La figura 3 muestra un análisis por inmunofluorescencia utilizando células CHO transfectadas con CLD18A2 y un anticuerpo anti-CLD18 de conejo policlonal (Zymed, CRL 38-8000).

Las figuras 4A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 24H5 y 85A3 a células HEK293 transfectadas transitoriamente con CLD18A2 humano y un marcador fluorescente según se determina por citometría de flujo.

La figura 4C muestra la unión de los sobrenadantes de hibridoma 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 a células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A2 humano y contrateñidas con yoduro de propidio.

La figura 5 muestra la unión de sobrenadantes de hibridoma 24H5 (A), 9E8 (B), 26B5 (C) y 19B9 (D) a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y CLD18A2 humano o CLD18A2-Myc o CLD18A2-HA analizados por citometría de flujo.

Las figuras 6A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 37H8, 43A11, 45C1 y 163E12 a células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A2 o CLD18A1 humano según se determina por citometría de flujo.

La figura 7 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal específico de isoforma CLD18A2 37G11 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones de fijación nativa (A, B) y paraformaldehído (C, D).

La figura 8 muestra un análisis de inmunofluorescencia del anticuerpo monoclonal CLD18 26B5 mediante tinción de células HEK293 transfectadas con CLD18A2 (A, C) y CLD18A1 (B, D), respectivamente, bajo condiciones de fijación nativa (A, B) y paraformaldehído (C, D).

Fig. 9. Línea celular PCR-RT El análisis por PCR-RT con cebadores específicos para CLD18A2 mostró una expresión clara en 4/5 de las líneas celulares ensayadas.

La figura 10 muestra un análisis por inmunofluorescencia de células DAN-G (subclón F2) y un anticuerpo policlonal de conejo-anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).

La figura 11 muestra un análisis por inmunofluorescencia de células KATO-III (subclón 3B9 4D5) y un anticuerpo policlonal de conejo-anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000).

La figura 12A muestra un análisis por inmunofluorescencia de células SNU-16 (subclón G5) con un anticuerpo policlonal de conejo-anti-CLD18 (Zymed, CRL 38-8000). La figura 12B muestra un análisis por inmunofluorescencia de células KATO-III con anticuerpos monoclonales de la enseñanza.

La figura 13 muestra la expresión superficial de CLD18 en células KATO-III y NUGC-4 analizadas por tinción de células con anticuerpos monoclonales 61C2 y 163E12 seguido por análisis citométrico de flujo.

La figura 14. Alineación de proteínas de CLD18A1 humano (NP_057453), CLD18A2 humano (NP_001002026), CLD18A1 de ratón (NP_062789) y CLD18A2 de ratón (AAL15636).

Las Figuras 15A y B muestran la unión de los sobrenadantes de hibridoma 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 y 163E12, respectivamente, a células HEK293 transfectadas transitoriamente con un marcador fluorescente y CLD18A1 murino o CLD18A2 murino analizada por citometría de flujo.

Fig 16. Análisis inmunohistoquímico con AB policlonal p105.

Las tinciones inmunohistoquímicas en un subconjunto de tejidos normales (estómago, pulmón, médula ósea y próstata) confirman la especificidad del tejido gástrico (A). La expresión también se detectó en carcinomas de estómago (fila superior) y carcinomas de pulmón (B). Sólo las células diferenciadas pero no las células madre expresan CLD18A2 (C).

Fig. 17. Análisis inmunohistoquímicos con monoclonal AB 39F11D7

(A) Se detectó expresión específica de proteína en la mucosa estomacal normal, mientras que todos los otros tejidos normales probados fueron negativos.

(B) Se encontró una expresión fuerte de CLD18A2 en carcinomas de estómago y pulmón.

Fig. 18. Análisis inmunohistoquímicos con AB 26B5 (A) monoclonal, 175D10 (B), 43A11 (C), 163E12 (D) y 45C1 (E). Todos los anticuerpos muestran fuerte tinción de tumores de xenoinjerto HEK293-CLD18A2 y muestras de cáncer gástrico, pero no de los tumores transfectados de control HEK293-Mock.

La figura 19 es un gráfico que compara el porcentaje de células muertas tras la inducción de CDC por 85A3, 28D10, 24H5 o 26D12 contra células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A2 humano usando citometría de flujo.

La figura 20 es un gráfico que compara el porcentaje de lisis celular específica después de la inducción de CDC por 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12 o 61C2 frente a células CHO adherentes transfectadas de forma estable con CLD18A2 humano o con CLD18A1 humano según se determina por medición de fluorescencia.

La figura 21 muestra la inducción dependiente de la concentración de CDC frente a células CHO transfectadas de forma estable con CLD18A2 humano mediante 75B8 (A), 28D10 (B) o 37H8 (C) según se determina mediante medición de fluorescencia.

La figura 22 muestra la lisis de células HEK293-CLD18A2 mediante 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de MNCs.

La figura 23 muestra la lisis de células HEK293-CLD18A1 mediante 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2, respectivamente, en presencia de MNCs.

La figura 24 muestra la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos de la enseñanza en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano con células HEK293-CLD18A2.

Las figuras 25A y B muestran una supervivencia prolongada por tratamiento con anticuerpos de la enseñanza en dos modelos de xenoinjerto de tratamiento temprano con células HEK293-CLD18A2.

La figura 26 muestra la prolongación de la supervivencia por anticuerpos de la enseñanza en un modelo de xenoinjerto de tratamiento avanzado con células HEK293-CLD18A2.

La figura 27A muestra la inhibición del crecimiento tumoral por anticuerpos de la enseñanza en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano. La figura 27B muestra la prolongación de la supervivencia por anticuerpos de la enseñanza en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano. Se usaron células DAN-G que expresan de forma endógena CLD18A2.

La figura 28 muestra la expresión de ARNm de CLD18A2 en tejidos de ratón. Las investigaciones por PCR-RT con cebadores específicos de CLD18A2 no mostraron ninguna expresión significativa en todos los tejidos normales probados, excepto el estómago. Se analizaron los siguientes tejidos normales: 1: intestino delgado, 2: bazo, 3: piel, 4: estómago, 5: pulmón, 6: páncreas, 7: ganglio linfático, 8: timo, 9: control negativo

La figura 29 muestra la expresión de CLD18 en estómago normal. El análisis inmunohistoquímico con el anticuerpo específico CLD18 del estómago del ratón revela el patrón de expresión conservado. Mientras que el epitelio superficial y las criptas más profundas expresan CLD18 en su superficie celular, la región central del cuello es negativa a CLD18.

La figura 30 muestra la tinción con hematoxilina y eosina de tejidos de estómago de ratones. Se muestra en vista general (A) y en detalle (B) el estómago de un ratón tratado con 37G11 en comparación con un ratón de control (C y D), que se trató sólo con PBS.

Las figuras 31A y B muestran la tinción citométrica de flujo de células HEK293 transfectadas de forma estable con CLD18A1 y A2 humanos, respectivamente, así como células endógenamente que expresan KATO-III con anticuerpos de la enseñanza (43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10).

La figura 32 muestra CDC en células que expresan CLD18A2 mediadas por anticuerpos quiméricos de la enseñanza.

La figura 33 muestra ADCC sobre células KATO-III mediadas por anticuerpos quiméricos de la enseñanza.

Descripción detallada de la enseñanza

- Los anticuerpos descritos en el presente documento pueden ser anticuerpos monoclonales aislados que se unen específicamente a un epítipo presente en CLD18. Los anticuerpos monoclonales aislados abarcados por la presente enseñanza incluyen anticuerpos IgA, IgG1-4, IgE, IgM e IgD. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, más particularmente un isotipo IgG1, kappa o IgG1, lambda. En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG3, más particularmente un isotipo IgG3, kappa o IgG3, lambda. En otra realización más, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4, más particularmente un isotipo lambda IgG4, kappa o IgG4. En aún otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgA1 o IgA2. En aún otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgM.
- En una realización la enseñanza se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a células que expresan CLD18, y preferiblemente (i) se unen a células que expresan CLD18A2, y (ii) no se unen a células que no expresan CLD18A2 pero que expresan CLD18A1. Los anticuerpos de la enseñanza preferiblemente (i) median la muerte de células que expresan CLD18A2, y (ii) no median la muerte de células que no expresan CLD18A2 sino que expresan CLD18A1.
- En otra realización, la enseñanza se refiere a anticuerpos que (i) se unen a células tumorales que expresan CLD18, (ii) no se unen a células que expresan CLD18 de mucosa estomacal normal, y/o (iii) no se unen a CLD18 que expresa células de tejido pulmonar no cancerígeno.
- La enseñanza también incluye anticuerpos que (i) median la muerte de células tumorales que expresan CLD18, (ii) no median la muerte de células que expresan CLD18 de la mucosa estomacal normal, y/o (iii) no median la muerte de células que expresan CLD18 de tejido pulmonar no cancerígeno.
- En realizaciones particulares, los anticuerpos de la enseñanza (i) se unen a un epítipo sobre CLD18A2 que no está presente en CLD18A1, preferiblemente SEQ ID NO: 21, 22, y 23, (ii) se unen a un epítipo localizado en el epítipo CLD18A2-bucle1, preferiblemente SEQ ID NO: 28, (iii) se unen a un epítipo localizado en el bucle CLD18A2, preferiblemente SEQ ID NO: 30, (iv) se unen a un epítipo localizado en el CLD18A2-bucle D3, preferiblemente SEQ ID NO: 31, (v) se unen a un epítipo, que abarca CLD18A2-bucle1 y CLD18A2-bucle D3, (vi) se unen a un epítipo no glicosilado localizado en el CLD18A2-bucle D3, preferiblemente SEQ ID NO: 29, o (vii) se unen a un epítipo presente en CLD18 humano y de ratón (SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, respectivamente).
- En realizaciones particularmente preferidas, los anticuerpos de la enseñanza se unen a un epítipo sobre CLD18A2 que no está presente en CLD18A1.
- Los anticuerpos de la enseñanza incluyen anticuerpos completamente humanos. Dichos anticuerpos pueden producirse en un animal transgénico no humano, por ejemplo, un ratón transgénico, capaz de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos frente a CLD18 sometiendo a recombinación V-D-J y conmutación de isotipos. Dicho animal transgénico puede ser también un conejo transgénico para producir anticuerpos policlonales tal como se describe en el documento US 2003/0017534.
- La unión de un anticuerpo de la enseñanza al antígeno CLD18 puede mediar la muerte de células que expresan CLD18 (por ejemplo, una célula tumoral), por ejemplo, por activación del sistema del complemento. La muerte de células que expresan CLD18 puede producirse por uno o más de los siguientes mecanismos: citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de células que expresan CLD18; apoptosis de células que expresan CLD18; fagocitosis de células efectoras de células que expresan CLD18; o célula citotóxica dependiente de anticuerpos de células efectoras (ADCC) de células que expresan CLD18.
- Con el fin de que la presente enseñanza pueda entenderse más fácilmente, se definen en primer lugar ciertos términos. A lo largo de la descripción detallada se exponen definiciones adicionales.

Definición de términos

- El término CLD18 se refiere a claudina-18 e incluye cualquier variante, incluyendo CLD18A1 y CLD18A2, conformaciones, isoformas y homólogos de especies de CLD18 que se expresan naturalmente por células o se expresan por células transfectadas con el gen CLD18. Preferiblemente, "CLD18" se refiere a CLD18 humano, en particular CLD18A2 (SEQ ID NO: 1, 2) y/o CLD18A1 (SEQ ID NO: 7, 8), más preferiblemente CLD18A2.
- El término "CLD18A1" incluye variantes, isoformas y homólogos de especies modificadas postraducción de CLD18A1 humano que se expresan naturalmente por células o se expresan en células transfectadas con el gen CLD18A1.
- El término "CLD18A2" incluye variantes, isoformas y homólogos de especies de CLD18A2 modificados postraducción que se expresan naturalmente por células o se expresan en células transfectadas con el gen CLD18A2.
- El término "variante de CLD18" abarcará (i) variantes de empalme de CLD18, (ii) CLD18 variantes modificadas postraducción, particularmente incluyendo variantes con diferente estado de N-glicosilación, (iii) variantes de conformación de CLD18, incluyendo particularmente CLD18 conformación-1, CLD18 conformación-2 y CLD18-conformación-3, (iv) variantes CLD18 libres y homotípicamente/heterotípicamente asociadas localizadas en las

uniones estrechas intercelulares, (v) CLD18 relacionadas con cáncer y CLD18 variantes no relacionadas con el cáncer.

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

Los términos "conformación" y "topología" describen cómo una molécula de membrana integral está posicionada en la membrana de la superficie celular y, en particular, cuáles de sus regiones son extracelulares y, por tanto, elegibles para anticuerpos. CLD18, por ejemplo, puede existir en tres conformaciones diferentes, lo que muy probablemente dependerá de si es prevalente como homómeros o heterómeros y si está integrado en estructuras de unión estrecha supramoleculares o "libre". Estos diferentes estados dan lugar a diferentes epítomos elegibles para anticuerpos.

De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" se refiere a cualquier estado patológico, incluyendo el cáncer, en particular las formas de cáncer descritas en el presente documento.

Por "tumor" se entiende un grupo anormal de células o tejido que crece por una proliferación celular rápida y no controlada y continúa creciendo después de que cesen los estímulos que iniciaron el nuevo crecimiento. Los tumores muestran parcial o total falta de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser benigno o maligno.

Por "metástasis" se entiende la diseminación de células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende de la separación de las células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales endoteliales para entrar en la cavidad corporal y los vasos y luego, después de ser transportado por la sangre, infiltración de órganos diana. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio diana depende de la angiogénesis. La metástasis tumoral a menudo ocurre incluso después de la extirpación del tumor primario porque las células tumorales o componentes pueden permanecer y desarrollar potencial metastásico. En una realización, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza se refiere a "metástasis a distancia" que se refiere a una metástasis que está alejada del tumor primario y del sistema de ganglios linfáticos regionales.

El término "tratamiento de una enfermedad" incluye curar, acortar la duración, mejorar, prevenir, ralentizar o inhibir la progresión o empeoramiento, o prevenir o retrasar la aparición de una enfermedad o sus síntomas.

De acuerdo con la enseñanza, una muestra puede ser cualquier muestra útil de acuerdo con la presente enseñanza, en particular una muestra biológica tal como una muestra de tejido, incluyendo fluidos corporales y/o una muestra celular y se puede obtener de la manera convencional tal como por biopsia de tejido, incluyendo biopsia de punzón, y tomando sangre, aspiración bronquial, esputo, orina, heces u otros fluidos corporales. Según la enseñanza, el término "muestra biológica" también incluye fracciones de muestras biológicas.

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

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

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

El término "anticuerpo quimérico" se refiere a aquellos anticuerpos en los que una porción de cada una de las secuencias de aminoácidos de cadenas pesada y ligera es homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o perteneciente a una clase particular, mientras que los restantes segmentos de la cadena son homólogos a secuencias correspondientes en otro. Típicamente, la región variable de cadenas tanto ligera como pesada imita las regiones variables de anticuerpos derivados de una especie de mamíferos, mientras que las porciones constantes son homólogas a secuencias de anticuerpos derivadas de otra. Una clara ventaja de tales formas quiméricas es que la región variable puede derivarse convenientemente de fuentes actualmente conocidas usando células B o hibridomas fácilmente disponibles de organismos huéspedes no humanos en combinación con regiones constantes derivadas, por ejemplo, de preparaciones celulares humanas. Aunque la región variable tiene la ventaja de facilidad de preparación y la especificidad no se ve afectada por la fuente, siendo la región constante humana, es menos probable que provoque una respuesta inmune de un sujeto humano cuando se inyectan los anticuerpos que la región constante de una fuente no humana. Sin embargo, la definición no se limita a este ejemplo particular.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo heterólogo" se define en relación con un organismo transgénico que produce tal anticuerpo. Este término se refiere a un anticuerpo que tiene una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico codificante correspondiente a la encontrada en un organismo que no está constituido por el organismo transgénico y que generalmente se deriva de una especie distinta del organismo transgénico.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo heterohíbrido" se refiere a un anticuerpo que tiene cadenas ligeras y pesadas de orígenes orgánicos diferentes. Por ejemplo, un anticuerpo que tiene una cadena pesada humana asociada con una cadena ligera de ratón es un anticuerpo heterohíbrido.

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

De acuerdo con la enseñanza, el término "unión" se refiere preferiblemente a "unión específica". Como se usa en el presente documento, "unión específica" se refiere a la unión del anticuerpo a un antígeno predeterminado. Típicamente, el anticuerpo se une con una afinidad correspondiente a un KD de aproximadamente 1×10^{-7} M o menos y se une al antígeno predeterminado con una afinidad correspondiente a un KD que es al menos dos órdenes de

magnitud menor que su afinidad por la unión a un antígeno no específico (por ejemplo, BSA, caseína) distinto del antígeno predeterminado o un antígeno estrechamente relacionado.

El término "KD" (M), tal como se utiliza aquí, pretende referirse a la constante de equilibrio de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

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

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

- 10 El término "de origen natural" tal como se utiliza en el presente documento como aplicado a un objeto se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, se produce naturalmente un polipéptido o secuencia polinucleotídica que está presente en un organismo (incluyendo virus) que puede ser aislado de una fuente en la naturaleza y que no ha sido intencionalmente modificado por el hombre en el laboratorio.

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

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

El término "molécula de ácido nucleico", tal como se utiliza aquí, pretende incluir moléculas de ADN y moléculas de ARN. Una molécula de ácido nucleico puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, pero preferiblemente es ADN de doble hebra.

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

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

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

- 40 El término "secuencia de control de expresión" comprende de acuerdo con los promotores de enseñanza, sitios de unión a ribosomas, potenciadores y otros elementos de control que regulan la transcripción de un gen o la traducción de un ARNm. En realizaciones particulares de la enseñanza, las secuencias de control de expresión pueden ser reguladas. La estructura exacta de las secuencias de control de la expresión puede variar en función de la especie o tipo de célula, pero generalmente comprende por ejemplo secuencias 5' no transcritas y 5' y 3' no traducidas que están implicadas en la iniciación de la transcripción y la traducción, respectivamente, tales como caja TATA, secuencia de taponado y secuencia CAAT. Más específicamente, las secuencias de control de expresión no transcritas en 5' comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del ácido nucleico unido funcionalmente. Las secuencias de control de expresión también pueden comprender secuencias potenciadoras o secuencias activadoras corriente arriba.

- 45 De acuerdo con la enseñanza, el término "promotor" o "región promotora" se refiere a una secuencia de ácido nucleico que está situada corriente arriba (5') con respecto a la secuencia de ácido nucleico que se expresa y controla la expresión de la secuencia proporcionando un sitio de reconocimiento y unión para la ARN polimerasa. La "región

promotora" puede incluir sitios de reconocimiento y unión adicionales para otros factores que están implicados en la regulación de la transcripción de un gen. Un promotor puede controlar la transcripción de un gen procariótico o eucariótico. Además, un promotor puede ser "inducible" y puede iniciar la transcripción en respuesta a un agente inductor o puede ser "constitutivo" si la transcripción no está controlada por un agente inductor. Un gen que está bajo el control de un promotor inducible no se expresa o sólo se expresa en una pequeña extensión si un agente inductor está ausente. En presencia del agente inductor, el gen se activa o el nivel de transcripción aumenta. Esto está mediado, en general, por unión de un factor de transcripción específico.

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

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

En una realización preferida, una molécula de ácido nucleico está de acuerdo con la enseñanza presente en un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se utiliza aquí en su sentido más general y comprende cualquier vehículo intermedio para un ácido nucleico que permita que dicho ácido nucleico, por ejemplo, sea introducido en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, para ser integrado en un genoma. Los vectores de este tipo son preferiblemente replicados y/o expresados en las células. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales. El término "plásmido", como se usa en el presente documento, se refiere generalmente a una construcción de material genético extracromosómico, usualmente un dúplex de ADN circular, que puede replicarse independientemente del ADN cromosómico.

Como el vector para la expresión de un anticuerpo, puede utilizarse cualquiera de un tipo de vector en donde la cadena pesada del anticuerpo y la cadena ligera están presentes en diferentes vectores o un tipo de vector en donde la cadena pesada y la cadena ligera están presentes en el mismo vector.

Las divulgaciones dadas en el presente documento con respecto a las secuencias específicas de ácido nucleico y aminoácidos, por ejemplo los que se muestran en el listado de secuencias, deben ser interpretados de manera que se refieran también a modificaciones de dichas secuencias específicas que resultan en secuencias que son funcionalmente equivalentes a dichas secuencias específicas, por ejemplo secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos específicos y secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos que exhiben propiedades idénticas o similares a las de las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ácido nucleico específicas. Una propiedad importante es retener la unión de un anticuerpo a su objetivo o mantener las funciones efectoras de un anticuerpo. Preferiblemente, una secuencia modificada con respecto a una secuencia específica, cuando reemplaza la secuencia específica en un anticuerpo retiene la unión de dicho anticuerpo a CLD18 y preferiblemente las funciones de dicho anticuerpo como se describe en el presente documento, por ejemplo lisis mediada por CDC o lisis mediada por ADCC.

Los expertos en la técnica apreciarán que en particular las secuencias de las regiones CDR, hipervariables y variables pueden modificarse sin perder la capacidad de unirse a CLD18. Por ejemplo, las regiones CDR serán idénticas o altamente homólogas a las regiones especificadas en el presente documento. Por "altamente homóloga" se contempla que se pueden hacer de 1 a 5, preferiblemente de 1 a 4, tales como 1 a 3 o 1 o 2 sustituciones en las CDR. Además, las regiones hipervariables y variables pueden ser modificadas de manera que muestren una homología sustancial con las regiones específicamente descritas en el presente documento.

Debe entenderse que los ácidos nucleicos específicos descritos aquí también incluyen ácidos nucleicos modificados con el fin de optimizar el uso de codones en una célula u organismo huésped particular. Las diferencias en el uso de codones entre organismos pueden conducir a una variedad de problemas relativos a la expresión génica heteróloga. La optimización de los codones mediante el cambio de uno o más nucleótidos de la secuencia original puede resultar en una optimización de la expresión de un ácido nucleico, en particular en la optimización de la eficacia de traducción, en un huésped homólogo o heterólogo en donde dicho ácido nucleico ha de expresarse. Por ejemplo, si se utilizan ácidos nucleicos derivados de humanos y que codifican regiones constantes y/o regiones estructurales de anticuerpos de acuerdo con la presente enseñanza, por ejemplo para preparar anticuerpos quiméricos o humanizados, puede preferirse modificar dichos ácidos nucleicos con el fin de optimizar el uso de codones, en particular si dichos ácidos nucleicos, opcionalmente fusionados a ácidos nucleicos heterólogos tales como ácidos nucleicos derivados de otros organismos como se describen en el presente documento, se expresan en células de un organismo diferente de humano tal como ratón o hámster. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas tales como las de SEQ ID NO: 40 y 45, respectivamente, pueden modificarse para incluir uno o más, preferiblemente al menos 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 y preferiblemente hasta 10, 15, 20, 25, 30, 50, 70 o 100 o más reemplazos de nucleótidos dando como resultado un uso optimizado del codón pero no dando como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos. Tales sustituciones de nucleótidos se refieren preferiblemente a reemplazos de nucleótidos en SEQ ID Nos: 40 y 45, respectivamente, seleccionados de los

5 reemplazos mostrados en la siguiente alineación de SEQ ID Nos: 40 y 45, respectivamente, con sus homólogos modificados y que no da como resultado un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada o se refieren a reemplazos correspondientes en posiciones correspondientes en otras secuencias de ácido nucleico que codifican regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas, respectivamente. Preferiblemente, se efectúan todas las sustituciones mostradas en las siguientes alineaciones de SEQ ID Nos: 40 y 45, respectivamente, con sus contrapartes modificadas que no dan lugar a un cambio en la secuencia de aminoácidos codificada en secuencias de ácido nucleico que codifican las regiones constantes de cadena ligera y pesada humanas, respectivamente.

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

```

CGTACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCT 60
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
CGTACGGTGGCCGCTCCACGCGTGTTCATCTTCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCC 60

GGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAG 120
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
GGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCGGGAGGCCAAGGTGCAG 120

TGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGAC 180
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
TGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGAC 180

AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAG 240
|||||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AGCAAGGACTCCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTGAGCAAGGCCGACTACGAG 240

AAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAG 300
|||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
AAGCACAAGGTGTACGCCGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAG 300

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

```

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

ES 2 905 951 T3

```

GGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCC 60
|||||  ||  |||||||||||||  ||  |||||||||||||  ||  |||||||||||||  ||
GGCCCAAGCGTGTTCCTCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGGCGGCACAGCCGCC 60

CTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC 120
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
CTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCCGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGA 120

GCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCC 180
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
GCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGC 180

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

GTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC 300
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
GTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGAC 300

AAAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTC 360
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
AAGACCCACACCTGCCCCCCTGCCAGCCCCAGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTTC 360

CTCTTCCCCC AAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGC 420
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
CTGTTCCCCC AAGCCAAGGACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCGAGGTGACCTGC 420

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

GTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGT 540
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
GTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGG 540

GTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGC 600
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
GTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGC 600

AAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGG 660
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
AAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGC 660

CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAAC 720
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
CAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAAC 720

CAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780
|||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  |||||||||||||  ||
CAGGTGTCCCTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG 780

GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGAC 840

```

GAGAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAAC	840
GGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTC	900
GGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTG	900
GTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAG	960
GTGTTTCTGAGCTGCAGCGTATGCACG	960
TCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	981
AGCCTGAGCCCCGGCAAGTAG	981

Además, puede ser deseable, de acuerdo con la presente enseñanza, modificar las secuencias de aminoácidos descritas en el presente documento, en particular las de las regiones constantes de la cadena pesada humana para adaptar la secuencia a un alotipo deseado, por ejemplo un alotipo encontrado en la población caucásica. Tales modificaciones se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en los siguientes reemplazos de aminoácidos dentro de SEQ ID NO: 46 o en posiciones correspondientes dentro de otras regiones constantes de cadena pesada humana: K93R, D235E y L237M. Preferiblemente, todas estas modificaciones se incluyen en secuencias de aminoácidos de regiones constantes de cadena pesada humana.

Según la enseñanza, el término "posiciones correspondientes" se refiere a nucleótidos o residuos de aminoácidos que en una secuencia de alineación de dos secuencias de ácido nucleico o proteína están alineados entre sí.

Preferiblemente, el grado de identidad entre una secuencia de ácido nucleico específica descrita en el presente documento y una secuencia de ácido nucleico que está modificada con respecto a dicha secuencia de ácido nucleico específica será al menos 70%, preferiblemente al menos 75%, más preferiblemente al menos 80 en peso, incluso más preferiblemente al menos 90% o más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98% o 99%. Preferiblemente, las dos secuencias son capaces de hibridarse y formar un dúplex estable entre sí, realizándose la hibridación preferiblemente en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas se describen, por ejemplo, en *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, J. Sambrook et al., Editors, 2ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a hibridación a 65°C en regulador de hibridación (3.5 x SSC, Ficoll 0.02%, polivinilpirrolidona al 0.02%, albúmina de suero bovino al 0.02% , 2.5 mM de NaH₂PO₄ (pH 7), 0.5% de SDS, 2 mM de EDTA). SSC es cloruro sódico 0.15 M/citrato sódico 0.15 M, pH 7. Después de la hibridación, la membrana a la que se ha transferido el ADN se lava, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y luego en 0.1-0.5 x SSC/0.1 x SDS a temperaturas de hasta 68°C.

Preferiblemente, el grado de similitud, preferiblemente la identidad entre una secuencia de aminoácidos específica descrita en el presente documento y una secuencia de aminoácidos que está modificada con respecto a dicha secuencia de aminoácidos específica, tal como entre secuencias de aminoácidos que muestran homología sustancial, será al menos 70%, preferiblemente al menos 80%, incluso más preferiblemente al menos 90% o más preferiblemente al menos 95%. 96%. 97%. 98% o 99%.

Todas las secuencias modificadas descritas anteriormente están dentro del alcance de la presente enseñanza. "Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservativas de aminoácidos. La "identidad de secuencia" entre dos polipéptidos o secuencias de ácido nucleico indica el porcentaje de aminoácidos o nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

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

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

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

La presente enseñanza comprende anticuerpos en los que se han realizado alteraciones en la región Fc con el fin de cambiar las propiedades funcionales o farmacocinéticas de los anticuerpos. Tales alteraciones pueden resultar en una disminución o aumento de la unión de C1q y CDC o de la unión de FcγR y ADCC. Las sustituciones se pueden hacer, por ejemplo, en uno o más de los restos de aminoácidos de la región constante de la cadena pesada, causando de este modo una alteración en una función efectora mientras que conservan la capacidad de unirse al antígeno en comparación con el anticuerpo modificado, por ejemplo, US 5,624,821 y US 5,648,260.

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

Además, el patrón de glicosilación de anticuerpos se puede modificar para cambiar la función efectora de los anticuerpos. Por ejemplo, los anticuerpos pueden expresarse en un transfectoma que no añade la unidad de fucosa normalmente unida a Asn en la posición 297 de la región Fc con el fin de aumentar la afinidad de la región Fc por los receptores Fc que, a su vez, dará como resultado un ADCC aumentado de los anticuerpos en presencia de células NK, por ejemplo Shield et al. (2002) JBC, 277: 26733. Además, la modificación de la galactosilación puede hacerse con el fin de modificar los CDC.

Alternativamente, en otra realización, las mutaciones pueden introducirse aleatoriamente a lo largo de toda o parte de una secuencia codificante del anticuerpo anti-CLD18, tal como por mutagénesis de saturación, y los anticuerpos anti-CLD18 modificados resultantes pueden ser seleccionados para determinar la actividad de unión.

El término "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se utiliza en el presente documento, pretende referirse a una célula en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante. Debe entenderse que tales términos pretenden referirse no sólo a la célula en cuestión sino a la progenie de dicha célula. Debido a que ciertas modificaciones pueden ocurrir en generaciones posteriores debido a mutaciones o influencias ambientales, tal progenie no puede, de hecho, ser idéntica a la célula madre, pero todavía está incluida dentro del alcance del término "célula huésped" como se usa en el presente documento. Las células huésped recombinantes incluyen, por ejemplo, transfectomas, tales como células CHO, células NS/O y células linfocíticas.

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

El término "animal transgénico" se refiere a un animal que tiene un genoma que comprende uno o más transgenes, preferiblemente transgenes de cadena pesada y/o ligera, o transcromosomas (integrados o no integrados en el ADN genómico natural del animal) y que es preferiblemente capaz de expresar los transgenes. Por ejemplo, un ratón transgénico puede tener un transgén humano de cadena ligera y un transgén humano de cadena pesada o transcromosoma de cadena pesada humana, de manera que el ratón produce anticuerpos anti-CLD18 humanos cuando se inmuniza con antígeno CLD18 y/o células que expresan CLD18. El transgén humano de cadena pesada puede integrarse en el ADN cromosómico del ratón, como es el caso para ratones transgénicos, por ejemplo, ratones HuMAb, tales como ratones HCo7 o HCo12, o el transgén humano de cadena pesada puede mantenerse extracromosómicamente, como es el caso de ratones transcromosómicos (por ejemplo, KM) como se describe en el documento WO 02/43478. Tales ratones transgénicos y transcromosómicos pueden ser capaces de producir múltiples isotipos de anticuerpos monoclonales humanos a CLD18 (por ejemplo, IgG, IgA y/o IgE) sometidos a recombinación V-D-J y conmutación de isotipo.

Mecanismos de acción del mAb

Aunque lo siguiente proporciona consideraciones con respecto al mecanismo subyacente a la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la enseñanza, no debe considerarse como limitante de la enseñanza de ninguna manera.

Los anticuerpos descritos en el presente documento interactúan preferiblemente con componentes del sistema inmune, preferiblemente mediante ADCC o CDC. Los anticuerpos de la enseñanza también pueden usarse para dirigir

cargas útiles (por ejemplo, radioisótopos, fármacos o toxinas) para matar directamente células tumorales o pueden usarse sinérgicamente con agentes quimioterapéuticos tradicionales, atacando tumores a través de mecanismos de acción complementarios que pueden incluir respuestas inmunitarias antitumorales que puede haber sido comprometida debido a los efectos secundarios citotóxicos de un quimioterapéutico sobre linfocitos T.

- 5 Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos. ADCC describe la capacidad de destrucción de células efectoras como se describe aquí, en particular linfocitos, que preferiblemente requiere que la célula diana esté marcada por un anticuerpo.

Preferiblemente, ADCC ocurre cuando los anticuerpos se unen a antígenos en células tumorales y los dominios Fc de anticuerpo se conectan con receptores Fc (FcR) sobre la superficie de células efectoras inmunes. Se han identificado 10 varias familias de receptores Fc, y las poblaciones celulares específicas expresan característicamente receptores Fc definidos. ADCC puede ser visto como un mecanismo para inducir directamente un grado variable de la destrucción inmediata del tumor que conduce a la presentación de antígenos y la inducción de respuestas de células T inducidas por tumores. Preferiblemente, la inducción *in vivo* de ADCC conducirá a respuestas de células T dirigidas por tumor y a respuestas de anticuerpos administrados en el huésped.

15 Citotoxicidad dependiente del complemento. CDC es otro método de muerte celular que puede ser dirigido por anticuerpos. IgM es el isotipo más eficaz para la activación del complemento. IgG1 e IgG3 son también muy eficaces para dirigir CDC a través de la clásica vía de activación del complemento. Preferiblemente, en esta cascada, la formación de complejos antígeno-anticuerpo da lugar a la separación de múltiples sitios de unión C1q en estrecha proximidad en los dominios C_H2 de moléculas de anticuerpos participantes, tales como moléculas de IgG (C1q es uno 20 de los tres subcomponentes del complemento C1). Preferiblemente, estos sitios de unión C1q no unidos a la cubierta convierten la interacción C1q-IgG previamente de baja afinidad a una de alta afeidez, lo que desencadena una cascada de eventos que implican una serie de otras proteínas del complemento y conduce a la liberación proteolítica de los agentes quimiotácticos/activadores de células efectoras C3a y C5a. Preferiblemente, la cascada del complemento termina en la formación de un complejo de ataque a la membrana, que crea poros en la membrana celular que facilitan 25 el paso libre de agua y solutos dentro y fuera de la célula.

Producción de anticuerpos

Los anticuerpos de la enseñanza pueden producirse mediante una variedad de técnicas, incluyendo la metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975). Aunque se prefieren procedimientos de hibridación de células somáticas, 30 en principio, pueden emplearse otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales, por ejemplo, transformación viral u oncogénica de linfocitos-B o técnicas de presentación de fagos utilizando bibliotecas de genes de anticuerpos.

El sistema animal preferido para preparar hibridomas que segregan anticuerpos monoclonales es el sistema murino. La producción de hibridoma en el ratón es un procedimiento muy bien establecido. En la técnica se conocen protocolos y técnicas de inmunización para el aislamiento de esplenocitos inmunizados para la fusión. También se conocen 35 parejas de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y procedimientos de fusión.

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

En aún otra realización preferida, se pueden generar anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra CLD18 usando ratones transgénicos o transcromosómicos que llevan partes del sistema inmune humano en lugar del sistema 40 de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones conocidos como ratones HuMAb y ratones KM, respectivamente, y se denominan colectivamente en el presente documento como "ratones transgénicos". La producción de anticuerpos humanos en tales ratones transgénicos puede realizarse como se describe en detalle para CD20 en WO2004 035607.

45 Otra estrategia para generar anticuerpos monoclonales es aislar directamente genes que codifican anticuerpos de linfocitos que producen anticuerpos de estrategia definida, por ejemplo véase Babcock et al., 1996; una nueva estrategia para generar anticuerpos monoclonales a partir de linfocitos únicos aislados que producen anticuerpos de estrategia definida. Para detalles de la ingeniería de anticuerpos recombinantes véase también Welschof and Kraus, anticuerpos recombinantes para terapia de cáncer ISBN-0-89603-918-8 y Benny K.C. Lo Antibody Engineering ISBN 50 1-58829-092-1.

Inmunizaciones

Para generar anticuerpos contra CLD18, los ratones pueden inmunizarse con péptidos conjugados con vehículo derivados de la secuencia CLD18, una preparación enriquecida de antígeno CLD18 expresado de forma recombinante o fragmentos de los mismos y/o células que expresan CLD18, como se describe. Alternativamente, los ratones pueden 55 inmunizarse con ADN que codifica el CLD18 humano de longitud completa (por ejemplo SEQ ID NO: 1) o fragmentos de los mismos, en particular los de las SEQ ID Nos: 15, 17 y 19. En el caso de que las inmunizaciones usando una proteína purificada o enriquecida la preparación del antígeno CLD18 no da lugar a anticuerpos, los ratones también

pueden inmunizarse con células que expresan CLD18, por ejemplo, una línea celular, para promover respuestas inmunes.

La respuesta inmunitaria puede monitorizarse a lo largo del curso del protocolo de inmunización con plasma y muestras de suero obtenidas por sangría de venas de la cola o retroorbitales. Se pueden utilizar ratones con títulos suficientes de inmunoglobulina anti-CLD18 para fusiones. Los ratones pueden ser estimulados intraperitonealmente o intravenosamente con células que expresan CLD18 3 días antes del sacrificio y eliminación del bazo para aumentar la tasa de hibridomas específicos que secretan anticuerpos.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales

Para generar hibridomas que producen anticuerpos monoclonales a CLD18, se pueden aislar y fusionar esplenocitos y células de nodos linfáticos de ratones inmunizados a una línea celular inmortalizada apropiada, tal como una línea celular de mieloma de ratón. Los hibridomas resultantes pueden entonces ser seleccionados para la producción de anticuerpos específicos de antígeno. Los pozos individuales pueden entonces ser examinados por ELISA para detectar hibridomas que secretan anticuerpos. Por inmunofluorescencia y análisis FACS usando células que expresan CLD18, se pueden identificar anticuerpos con especificidad para CLD18. Los hibridomas secretores de anticuerpos pueden ser replantados, rastreados de nuevo, y si todavía son positivos para los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 se pueden subclonar mediante dilución limitante. Los subclones estables pueden luego cultivarse *in vitro* para generar anticuerpos en medio de cultivo tisular para caracterización.

Generación de transfectomas que producen anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos de la enseñanza también se pueden producir en un transfectoma de células huésped utilizando, por ejemplo, una combinación de técnicas de ADN recombinante y métodos de transfección de genes como son bien conocidos en la técnica (Morrison, S. (1985) Science 229: 1202).

Por ejemplo, en una realización, el gen o genes de interés, por ejemplo, genes de anticuerpos, pueden ligarse a un vector de expresión tal como un plásmido de expresión eucariota tal como el utilizado por el sistema de expresión génica GS descrito en WO 87/04462, WO 89/01036 y EP 338 841 u otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. El plásmido purificado con los genes de anticuerpo clonado puede introducirse en células huésped eucarióticas tales como células CHO, células NS0, células HEK293T o células HEK293 o, alternativamente, otras células eucariotas como células derivadas de plantas, células de hongos o levaduras. El método utilizado para introducir estos genes puede ser métodos descritos en la técnica tales como electroporación, lipofectina, lipofectamina u otros. Después de la introducción de estos genes de anticuerpo en las células huésped, las células que expresan el anticuerpo pueden ser identificadas y seleccionadas. Estas células representan los transfectomas que pueden ser amplificados para su nivel de expresión y aumentados para producir anticuerpos. Los anticuerpos recombinantes pueden aislarse y purificarse a partir de estos sobrenadantes de cultivo y/o células. Alternativamente, los genes de anticuerpos clonados pueden expresarse en otros sistemas de expresión, incluyendo células procariotas, tales como microorganismos, por ejemplo *E. coli*. Además, los anticuerpos pueden producirse en animales no humanos transgénicos, tales como en leche de oveja y conejos o en huevos de gallina, o en plantas transgénicas; véase, por ejemplo Verma, R., et al. (1998) J. Immunol. Meth. 216: 165-181; Pollock, et al. (1999) J. Immunol. Meth. 231: 147-157; y Fischer, R., et al. (1999) Biol. Chem. 380: 825-839.

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

a) Quimerización

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

b) Humanización

Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que están localizados en las seis regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (CDR). Por esta razón, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDRs son más diversas entre los anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible expresar anticuerpos recombinantes que imitan las propiedades de anticuerpos naturales que ocurren naturalmente construyendo vectores de expresión que incluyen secuencias CDR del anticuerpo natural específico injertado sobre secuencias estructurales de un anticuerpo diferente con diferentes propiedades (véase, por ejemplo, Riechmann, L. et al. (1998) *Nature* 332: 323-327, Jones, P. et al. (1986) *Nature* 321: 522-525 y Queen, C. et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033). Dichas secuencias armazón pueden obtenerse a partir de bases de datos de ADN públicas que incluyen secuencias génicas de anticuerpos de la línea germinal. Estas secuencias de la línea germinal se diferencian de las secuencias de genes de anticuerpos maduros porque no incluirán genes variables ensamblados completamente, los cuales están formados por la unión de V (D) J durante la maduración de células B. Las secuencias de los genes de la línea germinal también diferirán de las secuencias de un anticuerpo del repertorio secundario de alta afinidad en el individuo uniformemente a través de la región variable. Por ejemplo, las mutaciones somáticas son relativamente infrecuentes en la porción amino terminal de la región de armazón 1 y en la porción carboxi terminal de la región de armazón 4. Además, muchas mutaciones somáticas no alteran significativamente las propiedades de unión del anticuerpo. Por esta razón, no es necesario obtener toda la secuencia de ADN de un anticuerpo particular para recrear un anticuerpo recombinante intacto que tiene propiedades de unión similares a las del anticuerpo original (véase el documento WO 99/45962). Las secuencias de cadena ligera y pesada parciales que abarcan las regiones CDR son típicamente suficientes para este propósito. La secuencia parcial se utiliza para determinar qué variables genéticas y segmentos génicos de unión contribuyen a los genes variables del anticuerpo recombinado. La secuencia de la línea germinal se utiliza entonces para rellenar las partes faltantes de las regiones variables. La secuencia líder de cadena pesada y ligera se escinde durante la maduración de la proteína y no contribuyen a las propiedades del anticuerpo final. Para añadir secuencias faltantes, las secuencias de cADN clonadas pueden combinarse con oligonucleótidos sintéticos por ligación o amplificación por PCR. Alternativamente, la región variable entera se puede sintetizar como un conjunto de oligonucleótidos cortos y solapantes y combinarse mediante amplificación por PCR para crear un clon de región variable totalmente sintético. Este proceso tiene ciertas ventajas tales como eliminación o inclusión o sitios de restricción particulares, u optimización de codones particulares.

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

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

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

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

Unión a las células que expresan el antígeno

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

5 Caracterización de la unión de anticuerpos

Para purificar anticuerpos anti-CLD18, se pueden cultivar hibridomas seleccionados en matraces giratorios de dos litros para purificación de anticuerpos monoclonales. Alternativamente, pueden producirse anticuerpos anti-CLD18 en biorreactores basados en diálisis. Los sobrenadantes pueden ser filtrados y, si es necesario, concentrados antes de la cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La IgG eluida se puede verificar mediante electroforesis en gel y cromatografía líquida de alto rendimiento para asegurar la pureza. La solución reguladora se puede intercambiar por PBS, y la concentración puede determinarse mediante OD280 usando un coeficiente de extinción de 1.43. Los anticuerpos monoclonales pueden dividirse en alícuotas y almacenarse a -80°C.

Para determinar si los anticuerpos monoclonales anti-CLD18 seleccionados se unen a epítopos únicos, se puede usar la mutagénesis dirigida al sitio o multisitio.

15 Determinación del isotipo

Para determinar el isotipo de anticuerpos purificados, se pueden realizar isotipos ELISA con diversos kits comerciales (por ejemplo, Zymed, Roche Diagnostics). Los pozos de placas de microvaloración pueden recubrirse con Ig anti-ratón. Después del bloqueo, las placas se hacen reaccionar con anticuerpos monoclonales o controles de isotipo purificados, a temperatura ambiente durante dos horas. Los pozos pueden entonces hacerse reaccionar con cualquiera de las sondas conjugadas con peroxidasa de IgG1, IgG2a, IgG2b o IgG3 de ratón, IgA o IgM específica de ratón. Después del lavado, las placas se pueden desarrollar con sustrato ABTS (1 mg/ml) y se analizan a una OD de 405-650. Alternativamente, se puede usar el kit de isotipos de anticuerpos monoclonales de ratón IsoStrip (Roche, No. de cat. 1493027) como lo describe el fabricante.

Análisis de citometría de flujo

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD 18, puede usarse citometría de flujo. Las líneas celulares que se expresan naturalmente o después de la transfección CLD18 y los controles negativos que carecen de expresión de CLD18 (cultivadas bajo condiciones de crecimiento estándar) pueden mezclarse con diversas concentraciones de anticuerpos monoclonales en sobrenadantes de hibridomas o en PBS que contienen FBS al 1% y pueden incubarse a 4°C durante 30 minutos. Después del lavado, el anticuerpo anti-IgG marcado con APC o Alexa647 puede unirse al anticuerpo monoclonal unido a CLD18 en las mismas condiciones que la tinción primaria del anticuerpo. Las muestras se pueden analizar por citometría de flujo con un instrumento FACS utilizando la luz y las propiedades de dispersión lateral a la puerta de las células individuales, vivas. Con el fin de distinguir los anticuerpos monoclonales específicos para CLD18 de los aglutinantes no específicos en una sola medición, se puede emplear el método de cotransfección. Las células transfectadas transitoriamente con plásmidos que codifican CLD18 y un marcador fluorescente pueden teñirse como se ha descrito anteriormente. Las células transfectadas se pueden detectar en un canal de fluorescencia diferente que las células teñidas con el anticuerpo. Como la mayoría de las células transfectadas expresan ambos transgenes, los anticuerpos monoclonales específicos de CLD18 se unen preferentemente a las células que expresan el marcador de fluorescencia, mientras que los anticuerpos no específicos se unen en una proporción comparable a las células no transfectadas. Se puede usar un ensayo alternativo usando microscopía de fluorescencia además o en lugar del ensayo de citometría de flujo. Las células pueden teñirse exactamente como se ha descrito anteriormente y examinarse mediante microscopía de fluorescencia.

Las proteínas de unión estrecha tienden a ser internalizadas, si el contacto de las células con células vecinas de células particularmente adherentes se pierde, por ejemplo, por desprendimiento de células. La expresión en la superficie celular de CLD18 puede optimizarse mediante a) ajuste de las condiciones de cultivo, (por ejemplo EDTA/PBS 2 mM o acutasa), procesamiento a temperatura ambiente y adición de inhibidores de endocitosis (por ejemplo, azida de sodio) o activadores de transcripción o traducción de CLD18, y por b) selección y clonación de células que mantienen CLD 18 en altos niveles en la superficie celular, por ejemplo por selección con antibióticos en términos de células transfectadas, por clasificación de células inmunomagnéticas o FACS, y por clonación de dilución limitada.

Microscopía de inmunofluorescencia

Con el fin de demostrar la presencia de anticuerpos anti-CLD18 en sueros de ratones inmunizados o la unión de anticuerpos monoclonales a células vivas que expresan CLD18, se puede utilizar el análisis de microscopía de inmunofluorescencia. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan espontáneamente o después de transfección CLD18 y controles negativos que carecen de expresión de CLD18 se hacen crecer en portaobjetos de cámara en condiciones de crecimiento estándar en medio DMEM/F12, suplementado con suero de ternera fetal (FCS) al 10%, L-glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. Las células pueden entonces fijarse con

metanol o paraformaldehído o no ser tratadas. Las células pueden entonces hacerse reaccionar con anticuerpos monoclonales contra CLD18 durante 30 minutos a 25°C. Después del lavado, las células se pueden hacer reaccionar con un anticuerpo secundario de IgG anti-ratón marcado con Alexa555 (Molecular Probes) en las mismas condiciones. Las células pueden ser examinadas entonces por microscopía de fluorescencia.

- 5 Los niveles totales de CLD18 en las células se pueden observar cuando las células están fijadas con metanol o fijadas con paraformaldehído y permeabilizadas con Triton X-100. En las células vivas y no permeabilizadas, puede examinarse la localización de CLD18 en la superficie de células fijadas con paraformaldehído. Adicionalmente, la orientación de CLD18 a uniones estrechas puede analizarse mediante la cotinción con marcadores de unión estrechos tales como ZO-1. Además, se pueden examinar los efectos de la unión a anticuerpos y la localización de CLD18 dentro de la membrana celular.

Inmunoprecipitación Western

- 15 La IgG anti-CLD18 se puede ensayar adicionalmente con respecto a la reactividad con el antígeno CLD18 por Inmunoprecipitación Western. En resumen se pueden preparar extractos celulares de células que expresan CLD18 y controles negativos apropiados y se someten a electroforesis en gel de poli(acrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS). Después de la electroforesis, los antígenos separados se transferirán a membranas de nitrocelulosa, se bloquearán y se probarán con los anticuerpos monoclonales por ensayar. La unión a IgG se puede detectar usando peroxidasa IgG anti-ratón y se desarrolla con sustrato ECL.

Inmunohistoquímica

- 20 Las IgG de ratón anti-CLD18 se pueden ensayar adicionalmente con respecto a la reactividad con el antígeno CLD18 por inmunohistoquímica de una manera bien conocida por el experto en la técnica, por ejemplo utilizando crio secciones fijadas con paraformaldehído o acetona o secciones de tejido embebidas en parafina fijadas con paraformaldehído a partir de tejidos no cancerosos o muestras de tejido cancerígeno obtenidas de pacientes durante procedimientos quirúrgicos de rutina o de ratones portadores de tumores xenoinjertos inoculados con líneas celulares que expresan espontáneamente (por ejemplo DAN-G, SNU-16, o KATO-III) o después de la transfección (por ejemplo, HEK293) CLD18. Para la inmunocoloración se pueden incubar anticuerpos reactivos a CLD18 seguidos de anticuerpos de cabra anti-ratón o de cabra anti-conejo (DAKO) conjugados con peroxidasa de rábano picante de acuerdo con las instrucciones de los proveedores.

Actividades fagocíticas y de muerte de células de los anticuerpos *in vitro*

- 30 Además de unirse específicamente a CLD18, los anticuerpos anti-CLD18 pueden ensayarse en cuanto a su capacidad para mediar la fagocitosis y la muerte de células que expresan CLD18. El ensayo de la actividad del anticuerpo monoclonal *in vitro* proporcionará un cribado inicial antes de ensayar modelos *in vivo*.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC):

- 35 En resumen, las células polimorfonucleares (PMN), células NK, monocitos, células mononucleares u otras células efectoras, de donantes sanos pueden purificarse mediante centrifugación por densidad de Ficoll Hypaque, seguido de lisis de eritrocitos contaminantes. Las células efectoras lavadas pueden suspenderse en RPMI suplementado con suero de ternero fetal inactivado por calor al 10% o, alternativamente con suero humano inactivado por calor al 5% y mezclado con células diana marcadas con ⁵¹Cr que expresan CLD18, a diversas relaciones de células efectoras a células diana. Alternativamente, las células diana se pueden marcar con un ligando potenciador de la fluorescencia (BATDA). Un quelato altamente fluorescente de Europio con el ligando potenciador que se libera de las células muertas se puede medir con un fluorómetro. Otra técnica alternativa puede utilizar la transfección de células diana con luciferasa. El amarillo de lucifer añadido puede ser oxidado sólo por células viables. A continuación, pueden añadirse IgG anti-CLD18 purificadas a diversas concentraciones. Se puede usar IgG humana no relevante como control negativo. Los ensayos se pueden llevar a cabo durante 4 a 20 horas a 37°C dependiendo del tipo de célula efectora utilizado. Las muestras se pueden ensayar para la citólisis midiendo la liberación de ⁵¹Cr o la presencia del quelato de EuTDA en el sobrenadante del cultivo. Alternativamente, la luminiscencia resultante de la oxidación del amarillo de lucifer puede ser una medida de células viables.

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

Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC):

- 50 Los anticuerpos anti-CLD18 monoclonales pueden ensayarse en cuanto a su capacidad para mediar CDC usando una variedad de técnicas conocidas. Por ejemplo, el suero para el complemento puede obtenerse a partir de la sangre de una manera conocida por el experto en la materia. Para determinar la actividad de CDC de mAbs, se pueden usar diferentes métodos. La liberación de ⁵¹Cr se puede medir por ejemplo o se puede evaluar la permeabilidad a la membrana elevada usando un ensayo de exclusión de yoduro de propidio (PI). En pocas palabras, las células diana se pueden lavar y se pueden incubar 5 x 10⁵/ml con diversas concentraciones de mAb durante 10-30 minutos a temperatura ambiente o a 37°C. A continuación se puede añadir suero o plasma a una concentración final de 20%

(v/v) y las células se incuban a 37°C durante 20-30 minutos. Todas las células de cada muestra se pueden añadir a la solución PI en un tubo FACS. La mezcla puede entonces analizarse inmediatamente por análisis de citometría de flujo usando FACSArray.

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

Inhibición de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales:

Para probar la capacidad para iniciar la apoptosis, los anticuerpos anti-CLD18 monoclonales pueden incubarse, por ejemplo, con células tumorales positivas para CLD18, por ejemplo, células tumorales transfectadas con SNU-16, DAN-G, KATO-III o CLD18 a 37°C para aproximadamente 20 horas. Las células se pueden cosechar, lavar en regulador de unión Annexin-V (BD biosciences), y se incuban con Annexina V conjugada con FITC o APC (BD biosciences) durante 15 minutos en la oscuridad. Todas las células de cada muestra se pueden añadir a la solución PI (10 µg/ml en PBS) en un tubo FACS y se evalúan inmediatamente mediante citometría de flujo (como anteriormente).

Alternativamente, se puede detectar una inhibición general de la proliferación celular por anticuerpos monoclonales con kits comercialmente disponibles. El kit de proliferación de células DELFIA (Perkin-Elmer, No. de cat. AD0200) es un inmunoensayo no isotópico basado en la medición de la incorporación de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante la síntesis de ADN de células proliferantes en microplacas. La BrdU incorporada se detecta utilizando anticuerpo monoclonal marcado con europio. Para permitir la detección de anticuerpos, se fijan las células y se desnaturaliza el ADN utilizando la solución Fix. El anticuerpo no unido se elimina por lavado y se añade inductor DELFIA para disociar los iones de europio del anticuerpo marcado en solución, donde forman quelatos altamente fluorescentes con componentes del inductor DELFIA. La fluorescencia medida -utilizando fluorometría resuelta en el tiempo, en la detección- es proporcional a la síntesis de ADN en la célula de cada pozo.

Estudios preclínicos

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

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

Mapeo de epítomos

El mapeo de los epítomos reconocidos por anticuerpos de la enseñanza puede realizarse como se describe con detalle en "Epitope Mapping Protocols (Methods in Molecular Biology)" de Glenn E. Morris ISBN-089603-375-9 y en el "Mapeo de Epítomos: Un Enfoque práctico" Serie de enfoques prácticos, 248 por Olwyn M.R. Westwood, Frank C. Hay.

I. Moléculas biespecíficas/multiespecíficas que se unen a CLD18

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

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

Las moléculas biespecíficas y multispecíficas de la enseñanza pueden incluir además una tercera especificidad de unión, además de una especificidad de unión anti-Fc y una especificidad de unión anti-CLD18. En una realización, la tercera especificidad de unión es una porción de factor antipotenciación (EF), por ejemplo una molécula que se une a una proteína de superficie implicada en la actividad citotóxica y por lo tanto aumenta la respuesta inmune contra la célula diana. La "porción del factor antipotenciación" puede ser un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo funcional o un ligando que se une a una molécula dada, por ejemplo, un antígeno o un receptor, y da como resultado un aumento del efecto de los determinantes de unión para el Fc receptor o antígeno de célula diana. La "porción de factor antipotenciación" puede unirse a un receptor de Fc o un antígeno de célula diana. Alternativamente, la parte del factor antipotenciación puede unirse a una entidad que es diferente de la entidad a la que se unen las primeras y segundas especificidades de unión. Por ejemplo, la parte del factor antipotenciación puede unirse a una célula T citotóxica (por ejemplo, a través de CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD40, ICAM-1 u otra célula inmunitaria que da como resultado una respuesta inmune aumentada contra la célula diana).

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

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

En una realización, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo monoclonal, cuya unión no está bloqueada por la inmunoglobulina G (IgG) humana. Como se usa en el presente documento, el término "receptor de IgG" se refiere a cualquiera de los ocho genes de cadena gamma situados en el cromosoma 1. Estos genes codifican un total de doce isoformas de receptor transmembrana o soluble que se agrupan en tres clases de receptor Fc-gamma: Fc-GammaRI (CD64), Fc-gammaRII (CD32) y Fc-gammaRIII (CD 16). En una realización preferida, el receptor Fc-gamma es un Fc-gammaRI humano de alta afinidad.

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

En otras formas de realización preferidas, la especificidad de unión para un receptor Fc es proporcionada por un anticuerpo que se une a un receptor de IgA humano, por ejemplo, un receptor Fc-alfa (Fc-alfaRI (CD89)), cuya unión no está preferiblemente bloqueada por inmunoglobulina A humana (IgA). Se pretende que el término "receptor IgA" incluya el producto génico de un alfaeno (Fc-alfaRI) situado en el cromosoma 19. Se sabe que este gen codifica varias isoformas transmembranales acopladas alternativamente de 55 a 110 kDa. Fc-alfa-RI (CD89) se expresa constitutivamente en monocitos/macrófagos, granulocitos eosinófilos y neutrófilos, pero no en poblaciones de células no efectoras. Fc-alfaRI tiene una afinidad media tanto para IgA1 como para IgA2, que se incrementa después de la exposición a citoquinas tales como G-CSF o GM-CSF (Morton, H. C. et al (1996) Critical Reviews in Immunology 16: 423-440). Se han descrito cuatro anticuerpos monoclonales específicos de Fc-alfaRI, identificados como A3, A59, A62

y A77, que se unen a Fc-alfaRI fuera del dominio de unión al ligando de IgA (Monteiro, R.C. et al. (1992) J. Immunol. 148: 1764).

Fc-alphaRI y Fc-gammaRI son receptores de activación preferidos para uso en la enseñanza porque (1) se expresan principalmente en células efectoras inmunes, por ejemplo, monocitos, PMN, macrófagos y células dendríticas; (2) se expresan a altos niveles (por ejemplo, 5.000-100.000 por célula); (3) son mediadores de actividades citotóxicas (por ejemplo, ADCC, fagocitosis); (4) mediar la presentación mejorada del antígeno de los antígenos, incluyendo autoantígenos, dirigidos a ellos.

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

Un "anticuerpo específico de célula efectora" tal como se utiliza en el presente documento se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo funcional que se une al receptor Fc de células efectoras. Los anticuerpos preferidos para uso en la enseñanza del sujeto se unen al receptor Fc de células efectoras en un sitio que no está unido por inmunoglobulina endógena.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "célula efectora" se refiere a una célula inmune que está implicada en la fase efectora de una respuesta inmune, en oposición a las fases cognitiva y de activación de una respuesta inmune. Las células inmunitarias ejemplares incluyen células de origen mieloide o linfoide, por ejemplo, linfocitos (por ejemplo, células B y células T que incluyen células T citolíticas (CTL), células asesinas, células asesinas naturales, macrófagos, monocitos, eosinófilos, neutrófilos, polimorfonucleares, granulocitos, mastocitos y basófilos). Algunas células efectoras expresan receptores Fc específicos y llevan a cabo funciones inmunitarias específicas. En las realizaciones preferidas, una célula efectora es capaz de inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), por ejemplo, un neutrófilo capaz de inducir ADCC. Por ejemplo, los monocitos, los macrófagos, que expresan FcR, están implicados en la muerte específica de las células diana y en la presentación de antígenos a otros componentes del sistema inmune, o la unión a células que presentan antígenos. En otras realizaciones, una célula efectora puede fagocitar un antígeno diana, célula diana o microorganismo. La expresión de un FcR particular sobre una célula efectora puede ser regulada por factores humorales tales como citoquinas. Por ejemplo, se ha descubierto que la expresión de Fc-gammaRI está regulada por interferón gamma (IFN- γ). Esta expresión aumentada aumenta la actividad citotóxica de las células portadoras de Fc-gammaRI frente a dianas. Una célula efectora puede fagocitar o someter a lisis un antígeno diana o una célula diana.

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

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

En particular, se pueden preparar moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la presente enseñanza conjugando las especificidades de unión constituyentes, por ejemplo, las especificidades de unión anti-FcR y anti-CLD18, utilizando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cada especificidad de unión de la molécula biespecífica y multiespecífica puede ser generada separadamente y luego conjugada entre sí. Cuando las especificidades de unión son proteínas o péptidos, se puede usar una variedad de agentes de acoplamiento o reticulación para la conjugación covalente. Ejemplos de agentes reticulantes incluyen proteína A, carbodiimida, N-succinimidil-S-acetil-tioacetato (SATA), ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB), o-fenilendimaleimida (oPDM), N-succinimidil-3-(2-piridilditio) propionato (SPDP), y sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC) (ver, por ejemplo, Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160: 1686, Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 8648). Otros métodos incluyen los descritos por Paulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78.118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229: 81-83), y Glennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375). Los agentes de conjugación preferidos son SATA y sulfo-SMCC, ambos disponibles de Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

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

Alternativamente, ambas especificidades de unión se pueden codificar en el mismo vector y expresarse y ensamblarse en la misma célula huésped. Este método es particularmente útil cuando la molécula biespecífica y multiespecífica es mAb x mAb, mAb x Fab, Fab x F(ab')₂ o ligando x proteína de fusión Fab. Una molécula biespecífica y multiespecífica de la enseñanza, por ejemplo, una molécula biespecífica, puede ser una molécula de cadena sencilla, tal como un anticuerpo biespecífico de cadena única, una molécula biespecífica de cadena única que comprende un anticuerpo de cadena única y un determinante de unión, o una molécula biespecífica de cadena sencilla que comprende dos determinantes de unión. Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas también pueden ser moléculas de cadena sencilla o pueden comprender al menos dos moléculas de cadena sencilla. Los métodos para preparar moléculas bi y

multiespecíficas se describen por ejemplo en los documentos US 5,260,203; US 5,455,030; US 4,881,175; US 5,132,405; US 5,091,513; US 5,476,786; US 5,013,653; US 5,258,498; y US 5,482,858.

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

II. Inmunoconjugados

En otro aspecto, la presente enseñanza presenta un anticuerpo anti-CLD18 conjugado con un resto o agente terapéutico, tal como una citotoxina, un fármaco (por ejemplo, un inmunosupresor) o un radioisótopo. Tales conjugados se denominan en el presente documento como "inmunoconjugados". Los inmunoconjugados que incluyen una o más citotoxinas se denominan "inmunotoxinas". Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para, y en particular, mata células. Ejemplos incluyen taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorrubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y sus análogos u homólogos.

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

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

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

En una realización adicional, los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza se unen a un quelante de enlace, por ejemplo, tiuxetano, que permite que el anticuerpo se conjuge a un radioisótopo.

III. Composiciones Farmacéuticas

En otro aspecto, la presente enseñanza proporciona una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de anticuerpos de la presente enseñanza. Las composiciones farmacéuticas pueden formularse con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables así como cualesquiera otros adyuvantes

y excipientes conocidos de acuerdo con técnicas convencionales tales como las descritas en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19ª Edición, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. En una realización, las composiciones incluyen una combinación de múltiples (por ejemplo, dos o más) anticuerpos aislados de la enseñanza que actúan por mecanismos diferentes, por ejemplo, un anticuerpo que actúa predominantemente induciendo CDC en combinación con otro anticuerpo que actúa predominantemente por inducción de apoptosis.

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

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

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

En otra realización más, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse conjuntamente con radioterapia y/o trasplante autólogo de células madre periféricas o de médula ósea.

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

Todavía en una realización adicional, los anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse en combinación con un anticuerpo anti-C3b(i) con el fin de potenciar la activación del complemento.

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

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

Ejemplos de tales sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácido clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico y fosforoso, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenilo sustituidos, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, y ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos. Las sales de adición de base incluyen por ejemplo las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio y calcio, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina y procaína.

Una composición de la presente enseñanza puede ser administrada por una variedad de métodos conocidos en la técnica. Como apreciará el experto en la técnica, la ruta y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para la preparación de tales formulaciones son generalmente conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978.

Para administrar un compuesto de la enseñanza mediante ciertas vías de administración, puede ser necesario revestir el compuesto con, o coadministrar el compuesto con, un material para evitar su inactivación. Por ejemplo, el compuesto

se puede administrar a un sujeto en un vehículo apropiado, por ejemplo, liposomas, o un diluyente. Los diluyentes farmacéuticamente aceptables incluyen solución salina y soluciones reguladores acuosas. Los liposomas incluyen emulsiones de CGF agua-en-aceite-en-agua así como liposomas convencionales (Strejan et al., (1984) J. Neuroimmunol 7: 27).

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

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

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

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

Los regímenes de dosificación se ajustan para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Por ejemplo, se puede administrar un solo bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular composiciones parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y uniformidad de dosificación. La forma de unidad de dosificación tal como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación de las formas unitarias de dosificación de la enseñanza está dictada por y depende directamente de (a) las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que ha de alcanzarse, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica de la composición de tal compuesto activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

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

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

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

Las formulaciones de la presente enseñanza que son adecuadas para la administración vaginal también incluyen pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverización que contienen tales vehículos que son conocidos en la técnica como apropiada. Las formas de dosificación para la administración tópica o

transdérmica de composiciones de esta enseñanza incluyen polvos, aerosoles, ungüentos, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualesquiera conservantes, tampones o propelentes que puedan ser requeridos.

5 Las expresiones "administración parenteral" y "administradas parenteralmente" tal como se usan aquí significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, usualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardíaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal e infusión.

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

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la presencia de microorganismos puede garantizarse tanto por procedimientos de esterilización como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol y ácido fenólico sórbico. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales
20 como azúcares y cloruro sódico en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede ser provocada por la inclusión de agentes que retardan la absorción tal como monoestearato de aluminio y gelatina.

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

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

Los niveles de dosificación reales de los ingredientes activos en las composiciones farmacéuticas de la presente enseñanza se pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente particular, composición y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente.
35 El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente enseñanza empleada, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, edad, sexo, peso, condición, estado general de salud y antecedentes médicos previos del paciente que se va a tratar, y
40 factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

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

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

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

En otra realización más, los anticuerpos de acuerdo con la enseñanza pueden administrarse mediante un régimen que incluye una infusión de un anticuerpo contra CLD18 seguido de una infusión de un anticuerpo contra CLD18 conjugado con un radioisótopo. El régimen puede repetirse, por ejemplo, 7 a 9 días más tarde.

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

Muchos otros tales implantes, sistemas de suministro y módulos son conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la enseñanza pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrofílicos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos de la enseñanza atraviesan el BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, documentos US 4,522,811; US 5,374,548; y US 5,399,331. Los liposomas pueden comprender una o más unidades estructurales que se transportan selectivamente a células u órganos específicos y, por tanto, mejoran la liberación dirigida de fármacos (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol., 29: 685). Ejemplos de unidades estructurales de direccionamiento incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, US 5,416,016 de Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357: 140, M. Owais et al., (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39: 180); y el receptor de la proteína A del surfactante (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol., 1233: 134).

En una realización de la enseñanza, los compuestos terapéuticos de la enseñanza se formulan en liposomas. En una realización más preferida, los liposomas incluyen un resto de diana. En una realización más preferida, los compuestos terapéuticos en los liposomas se administran mediante inyección en bolo a un sitio próximo al área deseada, por ejemplo, el sitio de un tumor. La composición debe ser fluida en la medida en que exista una facilidad de jeringa. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

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

Una "dosificación terapéuticamente eficaz" para la terapia tumoral puede medirse por respuestas tumorales objetivas que pueden ser completas o parciales. Una respuesta completa (CR) se define como ausencia de evidencia clínica, radiológica u otra de la enfermedad. Una respuesta parcial (PR) resulta de una reducción en el tamaño del tumor agregado de más del 50%. El tiempo mediano hasta la progresión es una medida que caracteriza la durabilidad de la respuesta objetiva del tumor.

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

La composición debe ser estéril y fluida en la medida en que la composición puede ser suministrada mediante una jeringa. Además del agua, el vehículo puede ser una solución salina regulada isotónica, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos. En muchos casos, es preferible incluir

agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol o sorbitol, y cloruro de sodio en la composición. La absorción a largo plazo de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio o gelatina.

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

IV. Usos y métodos de la enseñanza

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

- 15 Un efecto terapéutico en los tratamientos descritos en el presente documento se consigue preferiblemente a través de las propiedades funcionales de los anticuerpos de la enseñanza para mediar la muerte de células, por ejemplo mediante la inducción de lisis mediada por citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), lisis mediada por citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), apoptosis, adhesión homotípica, y/o fagocitosis, preferiblemente mediante la inducción de la lisis mediada por CDC y/o lisis mediada por ADCC.

Por ejemplo, en una realización, los anticuerpos de la presente enseñanza pueden usarse para tratar un sujeto con un trastorno tumorigénico, por ejemplo, un trastorno caracterizado por la presencia de células tumorales que expresan CLD18 incluyendo, por ejemplo, cáncer gástrico.

- 25 Ejemplos de enfermedades tumorigénicas que pueden tratarse y/o prevenirse abarcan todos los cánceres que expresan CLD18 y entidades tumorales, incluyendo cáncer de estómago, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de la vesícula biliar y cáncer de cabeza y cuello. Estos cánceres pueden estar en etapas tempranas, intermedias o avanzadas, por ejemplo metástasis.

- 30 Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza también se pueden usar para inmunización o vacunación para prevenir una enfermedad descrita en el presente documento.

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

- 40 Los anticuerpos de la enseñanza pueden ensayarse inicialmente para determinar su actividad de unión asociada con usos terapéuticos o diagnósticos *in vitro*. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden ensayar usando ensayos de citometría de flujo como se describe en el presente documento.

- 45 Además, se puede ensayar la actividad de los anticuerpos en el desencadenamiento de al menos una actividad de células efectoras mediada por un efector, incluyendo la inhibición del crecimiento y/o la muerte de células que expresan CLD18. Por ejemplo, la capacidad de los anticuerpos para desencadenar CDC y/o apoptosis puede ser ensayada. Se describen aquí protocolos para ensayar CDC, adhesión homotípica, agrupación molecular o apoptosis.

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

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

CLD18A2 también se expresa en células estomacales normales diferenciadas. Los posibles efectos secundarios clínicos inducidos por el anticuerpo mediante la destrucción de estas células pueden reducirse o evitarse mediante la administración paralela de fármacos protectores del estómago tales como antiácidos o inhibidores de la bomba de protones gástrica tales como omeprazol o fármacos relacionados.

- 5 Las rutas adecuadas para administrar las composiciones de anticuerpos de la enseñanza *in vivo* e *in vitro* son bien conocidas en la técnica y pueden seleccionarse por los expertos en la materia.

Como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos anti-CLD18 de la enseñanza pueden ser coadministrados con uno u otros agentes terapéuticos, por ejemplo, un agente citotóxico, un agente radiotóxico, un agente antiangiogénico o un agente inmunosupresor para reducir la inducción de respuestas inmunitarias contra los anticuerpos de la enseñanza. El anticuerpo puede estar unido al agente (como un inmunocomplejo) o puede ser administrado separadamente del agente. En este último caso (administración separada), el anticuerpo puede administrarse antes, después o simultáneamente con el agente o puede coadministrarse con otras terapias conocidas, por ejemplo, una terapia anticancerosa, por ejemplo, una radiación. Tales agentes terapéuticos incluyen, entre otros, agentes antineoplásicos como los enumerados anteriormente. La coadministración de los anticuerpos anti-CLD18 de la presente enseñanza con agentes quimioterapéuticos proporciona dos agentes anticancerígenos que actúan a través de diferentes mecanismos dando lugar a un efecto citotóxico a las células tumorales. Dicha coadministración puede resolver problemas debidos al desarrollo de resistencia a fármacos o a un cambio en la antigenicidad de las células tumorales que las harían no reactivas con el anticuerpo.

En otra realización particular de la enseñanza, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un agente antiangiogénico que incluye anticuerpos dirigidos contra VEGF o VEGFR y uno o más compuestos químicos que inhiben la angiogénesis. El pretratamiento con o aplicación paralela de estos fármacos puede mejorar la penetración de anticuerpos en tumores a granel.

En otra realización particular de la enseñanza, el sujeto al que se administra el anticuerpo se trata adicionalmente con un compuesto que inhibe la señalización del receptor del factor de crecimiento incluyendo anticuerpos monoclonales que se unen al receptor EGFR así como compuestos químicos que inhiben la señalización iniciada por el EGFR, Her1 o Her2/receptor neu.

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

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

Las moléculas biespecíficas y multiespecíficas de la enseñanza pueden usarse también para modular los niveles de Fc-gammaR o Fc-alfaR en células efectoras, tales como la formación de tapones y la eliminación de receptores en la superficie celular. También se pueden usar mezclas de receptores anti-Fc para este fin.

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

Las composiciones de la enseñanza también se pueden administrar conjuntamente con complemento. Por consiguiente, dentro del alcance de la enseñanza se encuentran composiciones que comprenden anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas y suero o complemento. Estas composiciones son ventajosas porque el complemento está situado muy cerca de los anticuerpos, moléculas multiespecíficas o biespecíficas.

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

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

Por consiguiente, los pacientes tratados con composiciones de anticuerpos de la enseñanza pueden administrarse adicionalmente (antes, simultáneamente o después de la administración de un anticuerpo de la enseñanza) con otro agente terapéutico, tal como un agente citotóxico o radiotóxico, que realza o aumenta el efecto terapéutico de los anticuerpos de la enseñanza.

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

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

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

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

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

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

Ejemplos

1. Generación de anticuerpos murinos contra CLD18

a. Inmunizaciones:

Se inmunizaron ratones Balb/c o C57/BL6 con vectores de expresión eucarióticos, que codifican fragmentos CLD18 humanos (SEQ ID NO: 15, 16, 17, 18). Se inyectaron 50 μ g o 25 μ g de ADN plasmídico en los cuádriceps (intramuscular, i.m.) en los días 1 y 10 para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto1 o alternativamente en los días 1 y 9, 1 y 11, o 1, 16 y 36 para generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto2 en presencia de adyuvantes, por ejemplo CpG (para detalles ver Tab. 1b). CpG, así como las células transfectadas con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) solas o cotransfectadas adicionalmente con ARN codificante de CD40L soluble en murino se inyectaron intramuscularmente, se inyectó PEI-Man intramuscular o intraperitonealmente. La presencia de anticuerpos dirigidos contra CLD18 humano en sueros de ratones se monitorizó mediante microscopía de

fluorescencia inmune entre el día 16 y 43 dependiendo del protocolo de inmunización específico utilizado. La fluorescencia inmune se determinó usando células HEK293 transitoriamente transfectadas con un ácido nucleico que codifica una construcción de fusión que comprende CLD18A2 humano (SEQ ID NO: 1, 2) y una proteína informadora fluorescente. Los ratones con respuestas inmunes detectables (Figura 1) fueron reforzados tres días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto1, o los ratones se estimularon tres días, tres y dos días, o los ratones se estimularon cuatro, tres y dos días antes de la esplenectomía para la generación de anticuerpos monoclonales de Conjunto2 mediante inyección intraperitoneal de 5×10^7 o, alternativamente, 1×10^8 células HEK293 transfectadas transitoriamente con un ácido nucleico que codifica CLD18A2 humano (SEQ ID NOs: 1, 2) (para detalles ver Tab. 1b). En Tab. 1a, los protocolos de inmunización utilizados están dedicados a los respectivos anticuerpos monoclonales.

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

mAB	Protocolo de inmunización *	mAB	Protocolo de inmunización *
Conjunto1			
24H5	40	42E12	45
26B5	40	43A11	45
26D12	40	44E10	45
28D10	40	47D12	45
37G11	45	61C2	45
37H8	45	75B8	6
38G5	45	85A3	6
38H3	45	9E8	40
39F11	45	19B9	40
41C6	45		
Conjunto2			
45C1	53	166E2	51
125E1	45	175D10	51
163E12	51		
* Para los protocolos de inmunización específicos véase Tab.1b			

Tabla 1b: Protocolos de inmunización detallados

Protocolos de inmunización	Inmunización (cebado y promotores con ADN)			Monitorización del suero	Se promueve con células transfectadas		
	Con vectores de ADN que codifican fragmentos de CLD18	Con adyuvante	Un día	Un día	Las células transfectadas solo con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1)	Células cotransfectadas con CLD18A2 (SEQ ID NO: 1) y con ARN codificante de CD40L soluble en murino	Días antes de la esplenectomía

6	SEQ ID NO: 15: 50 µg	50 µg CpG	1 y 10	18	5 x 10 ⁷ células MC3T3 transfectada s	Ninguna	3
40	SEQ ID NO: 17: 50 µg	50 µg CpG	1 y 10	18		5 x 10 ⁷ células HEK293; 100 µg de CPG como adyuvante	3
45	SEQ ID NO: 15: 50 µg	50 µg CpG	1 y 9	16		1 x 10 ⁸ células HEK293	3
51	SEQ ID NO: 15: 25 µg	2.5 µl de PEI-Man* (150 mM) en H ₂ O con glucosa al 5%	1, 16 y 36	22, 30 y 43	5 x 10 ⁷ células HEK293 transfectada s	Ninguno	3 y 2
53	Cebado: SEQ ID NO: 15: 25 µg, y SEQ ID NO: 17: 25 µg; Aumento: SEQ ID NO: 17: 50 µg	50 µg de CpG en H ₂ O con glucosa al 5%	1 y 11	20	5 x 10 ⁷ células HEK293 transfectada s	Ninguno	4, 3 y 2
* In vivo-jetPEI™-Man de PolyPlus Transfection							

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

Se aislaron los esplenocitos de ratón y se fusionaron con PEG a una línea celular de mieloma de ratón basada en protocolos estándar. Los hibridomas resultantes se examinaron entonces para la producción de inmunoglobulinas con especificidad CLD18 usando células HEK293 transfectadas con un ácido nucleico que codifica CLD18 humano mediante análisis FACS.

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

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

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

identificados.

Definidas como Conjunto1, se generaron diecinueve líneas celulares de hibridoma, seis de una fusión de células de un ratón C57/BL6 inmunizado con CLD18A2-Bucle D3 (SEQ ID NO: 17, 18), trece de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle1 (SEQ ID NO: 15, 16), expresando los siguientes anticuerpos:

- 5 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9
24H5: anticuerpo monoclonal de ratón IgG2b, anticuerpo κ , 182-D758-034
26B5: anticuerpo monoclonal de ratón IgG2a, anticuerpo κ , 182-D758-035, DSM ACC2745
26D12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-036, DSM ACC2746
- 10 28D10: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-040, DSM ACC2747
37G11: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-055, DSM ACC2737
37H8: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-056, DSM ACC2738
38G5: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-057, DSM ACC2739
38H3: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-058, DSM ACC2740
- 15 39F11: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-059, DSM ACC2741
41C6: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-060
42E12: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-061, DSM ACC2748
43A11: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-062, DSM ACC2742
44E10: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-063
- 20 47D12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-064
61C2: IgG2b monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-067, DSM ACC2743
75B8: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D756-001
85A3: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D756-002
9E8: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-011
- 25 19B9: IgM monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-024

Definidas como Conjunto2, se generaron cinco líneas celulares de hibridoma, una de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle D3 (SEQ ID NO: 17, 18) y CLD18A2-Bucle D1 (SEQ ID NO: 15, 16), cuatro de una fusión de células de un ratón Balb/c inmunizado con CLD18A2-Bucle D1 (SEQ ID NO: 15, 16), que expresan los siguientes anticuerpos:

- 30 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10
45C1: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D758-187
125E1: IgG2a monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-279, DSM ACC2808
163E12: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-294, DSM ACC2809
166E2: IgG3 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-308
- 35 175D10: IgG1 monoclonal de ratón, anticuerpo κ , 182-D1106-362, DSM ACC2810

2. Producción de anticuerpos monoclonales

Producción y purificación de anticuerpos monoclonales reactivos a CLD 18:

- 40 Para producir cantidades de mg de anticuerpo para caracterización funcional, se sembraron células de hibridoma en biorreactores basados en diálisis (CELLLine CL1000, Integra, Chur, CH) a 2×10^6 células/ml. El anticuerpo que contenía el sobrenadante se recogió una vez por semana. El anticuerpo monoclonal de ratón se purificó usando Melon Gel (Pierce, Rockford, Estados Unidos) y se concentró mediante precipitación con sulfato de amonio o, alternativamente,

se purificó mediante ProteinA usando FPLC. La concentración de anticuerpos y la pureza se determinó mediante ensayo de BCA y se verificó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción con coomassie.

3. Características de unión de los anticuerpos monoclonales

a. Control de calidad de los transfectantes en WB, IF:

- 5 Para generar células que expresan CLD18A2, se transfectaron células HEK293 o CHO con ácidos nucleicos que codifican CLD18A2 (SEQ ID NO: 1, 2) o CLD18A2-myc (SEQ ID NO: 3, 4).

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

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

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

Se cotransfectaron células HEK293 con vectores de expresión que codificaban CLD18A2 humano (SEQ ID NO: 1, 2) y una proteína informadora fluorescente 40 h antes del ensayo o, alternativamente, células HEK293 que expresaban de forma estable CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) y se contratiñeron con yoduro de propidio (PI). Después del desprendimiento de células usando células EDTA/PBS 2 mM se lavaron con medio de crecimiento completo y se sembraron en placas de microtitulación de fondo en U aproximadamente 1-5 x 10⁵ células/pozo. Las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadante de hibridoma seguido por dos etapas de lavado con 1% de FBS/PBS terminoactivado y finalmente incubación con APC o anticuerpo secundario específico de IgG anti-ratón conjugado con Alexa647. Después de dos etapas de lavado, las células cotransfectadas se fijaron con CellFIX (BD Biosciences). La fijación se evaluó por citometría de flujo utilizando un BD FACSArray. La expresión del marcador de fluorescencia se representa en el eje horizontal frente a la unión del anticuerpo en el eje vertical. Todos los anticuerpos de ratón 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 se detectaron para unirse específicamente a la superficie de las células que expresan el marcador de fluorescencia (Figura 4, células en Q2) como se ejemplifica para los sobrenadantes de hibridoma que contienen anticuerpos monoclonales 24H5 (Figura 4A, células en Q2), 85A3 (Figura 4B), 175D10, 125E1, 163E12, 166E2 y 45C1 (Figura 4C, células en Q1).

c. Comparación de la unión del anticuerpo a CLD18A2 marcado con Myc- o HA:

Se especificaron adicionalmente las características de unión de los anticuerpos monoclonales específicos para CLD18 identificados. Por lo tanto, se analizó la unión de anticuerpos monoclonales a mutantes de CLD18A2, creados mediante la inserción de marcadores de epítipo. CLD18A2-HA (SEQ ID NO: 6) contiene una etiqueta de epítipo HA en CLD18A2-bucle1, mientras que CLD18A2-Myc (SEQ ID NO: 4) contiene una etiqueta de epítipo Myc insertada en CLD18A2-bucle2. Como la inserción de estas etiquetas provoca la destrucción de epítopos, los anticuerpos monoclonales identificados, pueden agruparse de acuerdo con la pérdida de unión a cualquiera de los mutantes. Las células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 humano, o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-HA, o con un marcador de fluorescencia y CLD18A2-Myc se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales específicos de CLD18 durante 30 minutos a 4°C, seguido de incubación con anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado con Alexa647. Antes del análisis en un BD FACSArray, las células se fijaron usando CellFIX. Como se ejemplifica para 24H5, 9E8, 26B5 y 19B9 en la Figura 5, los anticuerpos monoclonales pueden separarse basándose en sus características de unión en cuatro grupos diferentes: (i) anticuerpos que se unen a CLD18A2 no modificado así como a CLD18A2-HA y CLD18A2-Myc, por ejemplo 24H5, (Figura 5A), o (ii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA, por ejemplo 9E8, (Figura 5B), o (iii) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-Myc, por ejemplo 26B5, (Figura 5C), o (iv) anticuerpos que no se unen a CLD18A2-HA ni a CLD18A2-Myc, por ejemplo 19B9, (Figura 5D).

d. Comparación de la unión del anticuerpo a CLD18A1 humano frente a transfectantes de CLD18A2 por citometría de flujo:

- 55 La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales identificados a las isoformas de CLD18A2 se analizó por citometría de flujo. Se incubaron células HEK293 que expresaban de manera estable células CLD18A2 humanas (HEK293-CLD18A2) y HEK293 que expresaban de forma estable el CLD18A1 humano (SEQ ID NO: 7, 8) (HEK293-

CLD18A1) durante 30 minutos a 4°C con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales, seguido de incubación con anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado con Alexa647 y fijación de células o, alternativamente, sin fijación pero con contratinción de PI. La fijación se evaluó por citometría de flujo utilizando un BD FACSArray. La Figura 6 muestra ejemplos para los dos grupos de anticuerpos monoclonales que se identificaron en el panel compuesto por 24H5, 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12, 61C2, 75B8, 85A3, 9E8, 19B9, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2, 175D10: (i) los anticuerpos monoclonales 43A11, 45C1 y 163E12 se unen específicamente al CLD18A2 humano pero no al CLD18A1 humano (Figuras 6A, B), y (ii) el anticuerpo monoclonal 37H8 se une a ambas isoformas humanas (Figura 6A).

e. Comparación de la unión de anticuerpo a CLD18A1 humano frente a transfectantes de CLD18A2 por microscopía de inmunofluorescencia:

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

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

f. Determinación de líneas celulares que se expresan endógenamente:

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

g. Tinción de líneas celulares que se expresan endógenamente con anticuerpos específicos de CLD18 e inmunofluorescencia:

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

h. Tinción de líneas celulares que se expresan endógenamente, por citometría de flujo:

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

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

Los CLD18A2 humanos (NP_001002026) y CLD18A1 humanos (NP_057453) en una comparación de secuencias difieren en el terminal N - las variantes de CLD18 de ratón (NP_062789 y AAL15636) demuestran una elevada homología y sitios de variación de secuencia entre las moléculas (véase la Figura 14).

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

La unión de los anticuerpos monoclonales identificados a CLD18A2 y CLD18A1 murinos se analizó por citometría de flujo. Se incubaron células HEK293 cotransfectadas transitoriamente con un marcador de fluorescencia y CLD18A2 murino (SEQ ID NO: 33, 35) o con un marcador de fluorescencia y CLD18A1 murino (SEQ ID NO: 36, 37) con sobrenadantes de hibridoma que contenían los anticuerpos monoclonales específicos para CLD18 humano 38G5, 38H3, 37G11, 45C1 y 163E12, respectivamente, durante 30 minutos a 4°C, seguido por incubación con anticuerpo secundario de IgG anti-ratón conjugado con Alexa647 y fijación de células. La fijación se evaluó por citometría de flujo utilizando un BD FACSAArray. La Figura 15 muestra tres perfiles de unión diferentes: 38G5 y 45C1 no se unen a ninguna de las isoformas de CLD18 murino, 37G11 y 163E12 se unen a CLD18A2 murino pero no a CLD18A1 murino, y 38H3 se une a CLD18A1 murino y CLD18A2. Estos anticuerpos son valiosos para determinar una toxicidad potencial de anticuerpos monoclonales CLD18 en estudios preclínicos.

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

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

4. Inmunohistoquímica (IHC)

Se utilizó un anticuerpo específico de epítipo CLD18A2 generado por inmunización con el péptido de SEQ ID NO: 21 para la caracterización inmunohistoquímica de la expresión de CLD18A2. Se utilizaron secciones de tejido embebidas en parafina derivadas de un amplio panel de tejidos normales y tumorales para la expresión de proteínas y análisis de localización. No se detectó expresión significativa en ningún otro tejido normal de órganos, excepto el estómago (ver Tab. 2, Figura 16A). Por el contrario, la expresión de CLD18A2 se verificó por inmunohistoquímica en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de estómago y el cáncer de pulmón (Figura 16B).

Curiosamente, la expresión de la proteína CLD18A2 en la mucosa gástrica se restringió a las células terminalmente diferenciadas del epitelio gástrico en las regiones de base y de pozo. Por el contrario, las células de la región del cuello de la mucosa gástrica, en particular las células madre gástricas en la parte del istmo, que reponen toda la mucosa, no expresan CLD18A2 (Figura 16C).

Tabla 2: Expresión de CLD18A2 en tejidos normales y tumorales según se analizó por IHC

	Tipo de tejido	Resultado
30	Suprarrenal	-
	Vejiga	-
	Células de sangre	-
	Médula ósea	-
	Mama	-
35	Colon	-
	Endotelio	-
	Esófago	-
	Trompa de Falopio	-
	Corazón	-
40	Riñón (glomérulos, túbulos)	-
	Hígado	-
	Pulmón	-
	Ganglio Linfático	-
	Ovario	-
45	Páncreas	-
	Paratiroides	-

	Pituitaria	-
	Placenta	-
	Próstata	-
	Piel	-
5	Bazo	-
	Estómago	+
	Músculo estriado	-
	Testículos	-
	Timo	-
10	Tiroides	-
	Uréter	-
	Útero (cuello uterino, endometrio) -	

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

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

Se utilizó inmunohistoquímica para el análisis de especificidad de 175D10 (Figura 18B), 43A11 (Figura 18C), 163E12 (Figura 18D) y 45C1 (Figura 18E) en secciones derivadas de líneas celulares tumorales HEK293: líneas celulares tumorales HEK293 que expresan de forma estable el CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) o el CLD18A1 (HEK293-CLD18A1) o transfectadas con un plásmido de control de la expresión que contenía sólo el gen de resistencia a los antibióticos para la selección (HEK293-mock) se sometieron a xenoinjerto en ratones para formar tumores sólidos. No se detectó expresión en los tumores de xenoinjerto HEK293 transfectados de manera simulada. En contraste, se observó tinción de membrana fuerte y homogénea en tumores de xenoinjerto HEK293-CLD18A2 y en muestras de carcinoma de estómago.

5. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

a. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto1 medido por citometría de flujo:

El plasma para la lisis del complemento se preparó extrayendo sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer de S-Monovette-EDTA (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), los cuales fueron luego centrifugados a 600 g durante 20 minutos. Se recogió el plasma y se almacenó a -20°C.

En un primer conjunto de experimentos se analizaron los sobrenadantes de hibridoma para determinar su capacidad para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células HEK293 que expresan de forma estable el CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2). Las células se incubaron con sobrenadantes de hibridoma que contenían anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10, 24H5 o 26D12, respectivamente durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación (5 minutos a 450 g), se retiró el sobrenadante y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. Posteriormente, se determinó la lisis celular en FACS usando el método de tinción con yoduro de propidio (PI). Se añadió PI a una concentración final de 2.5 µg/ml. Para la citometría de flujo, se utilizó un citómetro de flujo BD FACSArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Se recogieron al menos 10000 eventos para el análisis con residuos celulares excluidos por ajuste del umbral de dispersión lateral hacia delante (FCS). El porcentaje de células lisadas (células PI positivas) se muestra en la Figura 19. Los anticuerpos monoclonales 85A3, 28D10 y 26D12 indujeron lisis de 33.5%, 38.2% y 39.2%, respectivamente, de células HEK293-CLD18A2, mientras que CDC mediada por 24H5 sólo fue 19.3%.

b. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto1:

En un segundo conjunto de experimentos se analizó la especificidad de anticuerpos monoclonales para inducir CDC en células que expresan CLD18A2. Por lo tanto, se ensayó un conjunto de anticuerpos que se unen o bien específicamente a CLD18A2 humano o también se unen a CLD18A1 humano para la inducción de CDC frente a células CHO transfectadas de forma estable con CLD18A2 humano (CHO-CLD18A2) o CLD18A1 humano (CHO-CLD18A1). Se sembraron células CHO-CLD18A2 y CHO-CLD18A1 24 h antes del ensayo con una densidad de 3 x

10⁴/pozo en placas de microtitulación de fondo plano de cultivo de tejidos. El medio de crecimiento del día siguiente se retiró y las células se incubaron por triplicado con sobrenadantes de hibridoma ajustados a una concentración de 10 µg/ml que contenían anticuerpos monoclonales 24H5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 38H3, 39F11, 41C6, 42E12, 43A11, 44E10, 47D12 y 61C2, respectivamente. Las células de control se incubaron con medio de crecimiento o medio de crecimiento que contenía saponina al 0.2% para la determinación de lisis de fondo y lisis máxima, respectivamente. Después de la incubación durante 20 minutos a temperatura ambiente se eliminó el sobrenadante y se añadió plasma 20% humano en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. A continuación, los sobrenadantes se reemplazaron por PBS que contenía 2.5 µg/ml de bromuro de etidio y la emisión de fluorescencia después de la excitación a 520 nm se midió usando un Tecan Safire. El porcentaje de lisis específica se calculó de la siguiente manera: % de lisis específica = (muestra de fluorescencia - fondo de fluorescencia)/(lisis de fluorescencia máxima - fondo de fluorescencia) x 100. La figura 20 muestra que los anticuerpos monoclonales 26D12, 28D10, 37H8, 38H3 y 39F11 median altos, el anticuerpo monoclonal 38G5 media el medio, los anticuerpos monoclonales 41C6 y 61C2 median bajo, y los anticuerpos monoclonales 24H5, 37G11, 42E12, 43A11, 44E10 y 47D12 no median CDC frente a células CHO-CLD18A2. Por el contrario, ninguno de los anticuerpos es capaz de inducir CDC frente a células CHO-CLDA1, aunque 26D12, 28D10, 37H8, 38H3, 39F11, 41C6, 47D12 y 61C2 también se unen a CLD18A1 determinado por citometría de flujo e inmunofluorescencia.

c. Titulación de anticuerpos monoclonales y CDC usando anticuerpos monoclonales de Conjunto1:

Para medir la capacidad de los anticuerpos anti-CLD18 para inducir CDC a bajas concentraciones, se realizó un experimento en donde se titularon tres anticuerpos diferentes. Se incubaron células CHO-CLD18A2 en placas de microtitulación con un intervalo de concentración de 75B8 (100, 30, 10, 3 y 1 µg/ml), 37H8 (10, 3.3 y 1 µg/ml) y 28D10 (10, 1 y 0.1 µg/ml), respectivamente, durante 20 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se retiró y se añadió plasma humano al 20% en DMEM (precalentado a 37°C) a las células y se incubó durante otros 20 minutos a 37°C. Antes del análisis utilizando un Tecan Safire, los sobrenadantes se reemplazaron por PBS que contenía 2.5 µg/ml de bromuro de etidio. Las Figuras 21A-C muestran el porcentaje de lisis específica en función de la concentración de anticuerpo. El anticuerpo monoclonal 75B8 induce la lisis de 31.0% de células CHO-CLD18A2 a 10 µg/ml y cae hasta 6.2% a 1 µg/ml (Figura 21A), mientras que los anticuerpos monoclonales 28D10 y 37H8 inducen todavía lisis específica del 39% y 26.5% al 1 µg/ml (Figura 21B, C), respectivamente.

d. CDC de anticuerpos monoclonales de Conjunto2 medido por citometría de flujo:

Se preparó suero para la lisis del complemento extrayendo sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer de Serum-Monovette (Sarstedt, Nürmbrecht, Alemania), los cuales fueron luego centrifugados a 600 g durante 20 minutos. Se recogió el suero y se almacenó a -20°C. El suero de control se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos antes del almacenamiento.

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

6. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

Se analizaron los sobrenadantes de hibridoma para determinar su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) frente a células HEK293 que expresan de forma estable CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2) o CLD18A1 humana (HEK293-CLD18A1).

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

b. Configuración de ADCC: Las células diana se marcaron con un ligando potenciador de fluorescencia (BADTA, ensayo de citotoxicidad Perkin Elmer, reactivos de citotoxicidad DELFIA EuTDA, No. de cat. ADO116) durante 30 minutos. Después de un lavado extensivo en RPMI-10 suplementado con probenecid 10 mM (Sigma, No. de cat. P8761), 10-20 mM de HEPES y 10% de suero de ternero fetal inactivado por calor, las células se ajustaron a 1 x 10⁵ células/ml. Se añadieron células diana etiquetadas, células efectoras (MNCs) y sobrenadantes que contenían anticuerpos monoclonales ajustados a una concentración de 10 µg/ml a placas de microtitulación de fondo redondo.

Para las células efectoras aisladas, se utilizó una relación efector a objetivo (E:T) de 100:1 (datos no mostrados para 50:1 y 25:1). Después de la incubación (2 horas, 37°C), los ensayos se detuvieron por centrifugación y la liberación de ligando de fluorescencia de los duplicados se midió en recuentos de europio en un fluorómetro resuelto en el tiempo. El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó usando la siguiente fórmula: % de lisis específica = (recuentos de liberación experimental - recuentos de liberación espontánea)/(recuentos máximos de liberación - recuentos de liberación espontánea) x 100, con liberación máxima de ligando de fluorescencia determinada añadiendo Triton X-100 0.25% de concentración final) a las células diana, y liberación espontánea medida en ausencia de anticuerpos y células efectoras. La Figura 22 muestra que los anticuerpos monoclonales 26B5, 37H8, 38G5, 47D12 y 61C2 median ADCC frente a células HEK293-CLD18A2. Por el contrario, estos anticuerpos no inducen ninguna citotoxicidad significativa o sólo de bajo nivel en las dianas CLD18A1 que demuestran un ADCC específico de CLD18A2 (Figura 23).

7. Inhibición de la proliferación

Los anticuerpos monoclonales murinos purificados se analizaron en cuanto a su capacidad para inhibir el crecimiento celular de células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humano.

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

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

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

8. Desempeño en modelos terapéuticos de xenoinjerto en ratón

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

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

Los ratones SCID se inocularon subcutáneamente con 1×10^7 células HEK293 que expresaban de forma estable altos niveles de CLD18A2 humano (HEK293-CLD18A2). Los niveles de expresión de CLD18A2 humano en células HEK293-CLD18A2 fueron comparables con los niveles de expresión en cánceres gástricos primarios de pacientes. Cada grupo de tratamiento experimental comprendía 10 ratones (número de ratones por grupo n=10). La terapia de ratones comenzó 3 días después de la inoculación del tumor. Se inyectaron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificado que representaban anticuerpos monoclonales murinos 26B5, 26D12, 28D10, 37G11, 37H8, 38G5, 39F11, 42E12, 43A11, 38H3 o 61C2 una vez por semana durante 4 semanas por vía intravenosa. Alternativamente se administraron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificado que contenían anticuerpos monoclonales murinos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 o 175D10 dos veces por semana durante 6 semanas alternando inyección intravenosa e intraperitoneal. El crecimiento tumoral de ratones tratados se monitorizó dos veces por semana (volumen tumoral = longitud x ancho x ancho dividido por 2 en mm³). Los ratones fueron sacrificados si el tumor alcanzaba un volumen de 500 mm³ o en caso de morbilidad severa. La Figura 24 ejemplifica la inhibición robusta del crecimiento de células tumorales HEK293-CLD18A2 por anticuerpos de la enseñanza. Las Figuras 25A y 25B muestran prolongación de la supervivencia por tratamiento con anticuerpos de la enseñanza en un modelo de xenoinjerto de tratamiento temprano utilizando células HEK293-CLD18A2.

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

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

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

Los ratones SCID se inocularon subcutáneamente con 2×10^5 células de la línea celular tumoral DAN-G, una línea celular infiltrante de adenocarcinoma pancreático humano que expresa constitutivamente la proteína CLD18A2 a nivel bajo. El tratamiento de ratones (10 por grupo) se inició 3 días después del injerto tumoral: se administraron 200 µg de sobrenadantes de hibridoma purificado que contenían anticuerpos monoclonales murinos 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 o 175D10 dos veces por semana durante 6 semanas alternando inyección intravenosa e intraperitoneal. Debido al crecimiento agresivo y rápido del tumor de la línea celular tumoral pancreática DAN-G, los ratones *in vivo* desarrollaron caquexia tumoral y murieron en pocos días. A pesar de que, como consecuencia, la ventana para medir los efectos terapéuticos fue estrecha, la inhibición del crecimiento tumoral y la supervivencia prolongada mediada por anticuerpos de la enseñanza también se observó en este modelo (Figuras 27A y 27B).

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

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

La expresión de CLD18A2 murino no fue detectable en ningún tejido normal probado, excepto el estómago (véase la Figura 28). Además, se usó un anticuerpo específico de CLD18A2, que reacciona de forma cruzada con CLD18A2 humano y de ratón, para el análisis inmunohistoquímico de la expresión de CLD18A2 en un gran panel de tejidos de ratón normales (véase Tab. 3). Excepto para el tejido gástrico normal, todos los tejidos normales probados no muestran expresión de CLD18A2. Como observamos para el CLD18A2 humano, también encontramos para la contraparte de ratón que mientras que el epitelio superficial y células de cripta más profundas expresan CLD18A2 en su superficie celular, la región central del cuello es CLD18A2 negativa (ver Figura 29A-C). En resumen, la distribución tisular de CLD18A2 parece ser idéntica en hombres y ratones.

Tabla 3: CLD 18 expresión dentro de los tejidos normales murinos como analizado por inmunohistoquímica

Tejido	expresión de CLD 18
Cerebelo	-
Cerebro	-
Colon	-
Esófago	-
Corazón	-
Riñón	-
Hígado	-
Pulmón	-
Ganglio Linfático	-
Ovario	-
Páncreas	-
Músculo esquelético	-
Bazo	-
Estómago	+
Timo	-
Vejiga	-

Además, investigamos los posibles efectos secundarios mediados por los anticuerpos 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10 en ratones. Todos estos anticuerpos habían sido previamente mostrados por análisis FACS para reaccionar con el CLD18A2 murino, así como con la proteína humana.

Tampoco se observaron efectos secundarios visibles en ratones durante y después del tratamiento con estos anticuerpos, ni correlacionados histomorfológicos de la toxicidad observada en la mucosa gástrica de ratones tratados con anticuerpos en comparación con ratones no tratados (tratados con PBS) (véase la Figura 30).

9. Quimerización de anticuerpos

a. Generación de anticuerpos monoclonales quiméricos de ratón/humano

Se preparó ARN total y posteriormente ADNc de cadena sencilla a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) humanas y de tejido de bazo humano por métodos estándar conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo utilizando RNeasy Midi Kit (Qiagen) y Superscript II Transcriptasa inversa (Invitrogen).

- 5 La región constante de la cadena ligera kappa humana se amplificó a partir de ADNc de PBMC mediante PCR. El oligómero en sentido (SEQ ID NO: 38) añadió un sitio de restricción BamHI en el extremo 5' de la región constante y cambió la secuencia de ácido nucleico original 5'-CGAAGT-3' que codifica los dos primeros aminoácidos (Arg-Thr) de la región constante en 5'-CGTACG-3', generando un sitio de restricción BsiWI sin cambiar la secuencia de aminoácidos. El oligómero antisentido (SEQ ID NO: 39) incluía un codón de parada y se añadió un sitio de restricción
- 10 NotI en el extremo 3' de la región constante amplificada. El producto de PCR así como un vector de expresión estándar (por ejemplo pADNc3.1 (+), Invitrogen) se incubaron secuencialmente con enzimas de restricción BamHI y NotI. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal de ternera para evitar la recirculación. La región constante se ligó finalmente al vector, de modo que cualquier fusión próxima de una región variable delante de la región constante es ahora posible a través de un sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') del sitio de clonación
- 15 múltiple del vector residual y vía el sitio de restricción BsiWI (5'-CGTACG-3') generado con el producto de PCR. La secuencia de la región constante de cadena ligera kappa humana insertada en el vector se lista como SEQ ID NO: 40, la secuencia de aminoácidos de la región constante kappa humana se lista como SEQ ID NO: 41.

- La región constante de la cadena pesada gamma-1 humana se amplificó a partir de ADNc de bazo por PCR. El oligómero en sentido 5' fosforilado (SEQ ID NO: 42) se colocó sobre el sitio de restricción Apal natural, situado 11
- 20 nucleótidos aguas abajo del comienzo de la región constante, y añadió un sitio de restricción HindIII en el extremo 5' de la parte amplificada de la región constante. El oligómero antisentido 5' fosforilado (SEQ ID NO: 43) incluyó un codón de parada y añadió un sitio de restricción NotI en el extremo 3' de la región constante así amplificada. El producto de PCR generado de este modo se terminó como y se fosforiló en 5'. Se comprobó que la región constante gamma amplificada era de la subclase IgG1 mediante PCR con un oligómero antisentido discriminante (SEQ ID NO: 44) y por
- 25 secuenciación. Se incubó un vector de expresión estándar (por ejemplo pADNc3.1 (+)/Hygro, Invitrogen) con una resistencia antibiótica diferente (por ejemplo higromicina) que la del vector utilizado para la expresión de la cadena ligera (por ejemplo neomicina) con enzima de restricción PmeI para eliminar completamente el sitio de clonación múltiple dejando extremos romos. El vector se trató adicionalmente con fosfatasa alcalina intestinal de ternera para
- 30 evitar la recirculación. La región constante se ligó finalmente al vector, de manera que cualquier fusión próxima de una región variable delante de la región constante es ahora posible a través del sitio de restricción HindIII (5'-AAGCTT-3') y a través del sitio de restricción Apal (5'-GGGCCC-3'), ambos generados con el producto de PCR. La orientación correcta de la región constante en el vector, es decir, adecuada para el promotor precedente del vector, se verificó por secuenciación. Debido a la posición del sitio de restricción Apal, cualquier amplificación de una región variable para este propósito tiene que incluir los primeros 11 nucleótidos de la secuencia de la región constante gamma-1 humana
- 35 además de la secuencia del sitio Apal. La secuencia de la región constante de la cadena pesada gamma-1 humana así amplificada insertada en el vector se lista como SEQ ID NO: 45, la secuencia de aminoácidos de la región constante gamma-1 humana así expresada se lista como SEQ ID NO: 46.

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

	Clon	mAb	Isotipo	Región variable	Par oligómero en PCR	Anticuerpo quimérico
cadena pesada	43A11	182-D1106-062	IgG2a	SEQ ID NO:55, 132	SEQ ID NO:70, 71	SEQ ID NO:100, 115
	163E12	182-D1106-294	IgG3	SEQ ID NO:56, 133	SEQ ID NO:72, 73	SEQ ID NO:101, 116
	125E1	182-D1106-279	IgG2a	SEQ ID NO:57, 134	SEQ ID NO:74, 75	SEQ ID NO:102, 117
	166E2	182-D1106-308	IgG3	SEQ ID NO:59, 136	SEQ ID NO:78, 79	SEQ ID NO:104, 119
	175D10	182-D1106-362	IgG1	SEQ ID NO:58, 135	SEQ ID NO:76, 77	SEQ ID NO:103, 118
	45C1	182-D758-187	IgG2a	SEQ ID NO:60, 137	SEQ ID NO:80, 81	SEQ ID NO:105, 120
cadena ligera	43A11	182-D1106-062	IgK	SEQ ID NO:62, 139	SEQ ID NO:84, 85	SEQ ID NO:107, 122
	163E12	182-D1106-294	IgK	SEQ ID NO:61, 138	SEQ ID NO:82, 83	SEQ ID NO:106, 121

	125E1	182-D1106-279	IgK	SEQ ID NO:63, 140	SEQ ID NO:86, 87	SEQ ID NO:108, 123
	166E2	182-D1106-308	IgK	SEQ ID NO:66, 143	SEQ ID NO:92, 93	SEQ ID NO:111, 126
	175D10	182-D1106-362	IgK	SEQ ID NO:65, 142	SEQ ID NO:90, 91	SEQ ID NO:110, 125
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:64, 141	SEQ ID NO:88, 89	SEQ ID NO:109, 124
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:67, 144	SEQ ID NO:94, 95	SEQ ID NO:112, 127
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:68, 145	SEQ ID NO:96, 97	SEQ ID NO:113, 128
	45C1	182-D758-187	IgK	SEQ ID NO:69, 146	SEQ ID NO:98, 99	SEQ ID NO:114, 129

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

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

Las regiones variables murinas identificadas se amplificaron entonces mediante PCR omitiendo la región 5' UTR y la región constante 3' del ratón, añadiendo sitios de restricción a los extremos que permitían la subclonación en los vectores de expresión preparados que llevaban las regiones constantes humanas. Además, los oligómeros sensibles proporcionaron una secuencia Kozak de consenso (5'-GCCGCCACC-3' o 5'-AGCCACC-3') y los oligómeros antisentido para regiones variables de cadena pesada incluyeron los primeros 11 nucleótidos de la región constante gamma-1 humana además del sitio de restricción Apal (ver Tab. 4, SEQ ID NO: 70 a 99). Las regiones variables de la cadena ligera Kappa se clonaron utilizando enzimas de restricción HindIII y BsiWI, las regiones variables de la cadena pesada gamma exigieron las enzimas de restricción HindIII y Apal. La región variable de la cadena gamma pesada del anticuerpo monoclonal 45C1 contenía un sitio de restricción HindIII interno -en este caso, se utilizó la enzima BsaI compatible (ver SEQ ID NO: 80)-. Las SEQ ID NO: 100 a 114 muestran las secuencias de ácidos nucleicos de los anticuerpos quiméricos resultantes (véase Tab. 4). SEQ ID NO: 115 a 129 muestran las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos quimerizados expresados de forma correspondiente (véase Tab. 4).

b. Generación y producción de anticuerpos quiméricos contra CLD18

Se generaron líneas celulares de mamífero que producían anticuerpos quiméricos con especificidad CLD18. Las líneas celulares derivadas de células HEK293T (ATCC CRL-11268). Un día antes de la transfección, se sembraron 2.5×10^7 células en un plato de cultivo de tejidos de 14.5 cm y se cultivaron en 20 ml de medio completo, o alternativamente 1×10^7 células se sembraron en una placa de cultivo de tejidos de 10 cm y se cultivaron en 10 ml de medio completo, o alternativamente se depositaron 0.6×10^6 células en un pozo de una placa de tejido de 12 pozos y se cultivaron en 2-3 ml de medio completo (medio completo: medio DMEM:F12 suplementado con FBS al 10% sin antibióticos). La densidad celular recomendada en el momento de la transfección debe ser de 90% de confluencia. Inmediatamente antes de la transfección, el medio se reemplazó por medio fresco. Se transfectaron células HEK293T con reactivos de

transfección, por ejemplo Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-019) o alternativamente polietilenimina (Sigma-Aldrich, 408727). Para la transfección de células HEK293T se utilizó una cantidad total de ADN de 110 µg o 296 µg para un plato de tejido de 14.5 cm, y la relación de agente de transfección a ADN fue de 1:2.5 y 1:12 para Lipofectamine 2000 y PEI, respectivamente. 24 h después de que el medio de transfección se reemplazó con un medio apropiado de GMP, por ejemplo X-Vivo 15 (Cambrex) o un medio definido químicamente como Pro293a (Cambrex) sin suero. Las células HEK293T transfectadas que producen anticuerpos monoclonales quiméricos contra CLD18 se cultivaron durante 96 horas más. Los sobrenadantes en bruto se cosecharon, se filtraron estériles y se purificaron mediante proteína Asepharose. La concentración de anticuerpos se determinó por ensayo de BCA y se verificó la pureza mediante electroforesis en gel de dodecilsulfato sódico y tinción con coomassie.

10 c. Características de unión de anticuerpos monoclonales quiméricos

La especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales quiméricos clonados y generados a CLD18A2 se analizó por citometría de flujo como se describe en el Ejemplo 3. Las células vivas HEK293 que expresan de forma estable células CLD18A2 humanas (HEK293-CLD18A2) y HEK293 que expresan de forma estable el CLD18A1 humano (SEQ ID NO: 7, 8) (HEK293-CLD18A1) se incubaron durante 30 minutos a 4°C con sobrenadantes de cultivo celular HEK293T purificados que contienen anticuerpos monoclonales quiméricos, seguido por incubación con anticuerpo secundario de Fcγ de IgG de cabra anti-IgG humano conjugado con APC F(ab')₂ y contratinción con PI. La fijación se evaluó por citometría de flujo utilizando un BD FACSArray.

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

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

d. Citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

25 Se preparó suero para la lisis del complemento extrayendo sangre de voluntarios sanos en tubos vacutainer de Serum-Monovette (Sarstedt, Nümbrecht, Alemania), los cuales fueron luego centrifugados a 600 g durante 20 min. Se recogió el suero y se almacenó a -20°C. El suero de control se inactivó por calor a 56°C durante 30 minutos antes del almacenamiento.

30 Se analizaron los anticuerpos quiméricos purificados por proteína Asepharose de esta enseñanza para determinar su capacidad para inducir citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD18A2 humano, así como células CHO-CLD18A2 transfectadas de forma estable. Las células se incubaron con anticuerpos monoclonales ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10, respectivamente, en una concentración final de 2.5 µg/ml a 35 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Se añadió suero humano al 20% en RPMI a las células y se incubó durante otros 30 minutos a 37°C. Posteriormente, las células muertas y vivas se discriminaron por tinción PI en una concentración final de 2.5 µg/ml y el porcentaje de lisis celular mediada por anticuerpos se determinó mediante citometría de flujo. Para el análisis de citometría de flujo se utilizó un citómetro de flujo BD FACSArray (BD Biosciences, Mountain View, CA). Al menos 10000 eventos se recogieron para el análisis con residuos celulares excluidos por el ajuste de la parte delantera hacia el lado de dispersión (FSC/SSC) umbral. La lisis específica se calculó mediante la siguiente fórmula: lisis específica = (% de células PI positivas en muestras - % de células PI positivas en la muestra con suero inactivado por calor). La lisis específica mediada por CDC se mostró para varios anticuerpos. Los tres anticuerpos mediada por CDC robusto en células CHO-CLD18A2 (Figura 32). En las células KATOIII, los anticuerpos ch-163E12 y ch-175D10 fueron inductores de CDC robustos.

e. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC)

45 Se analizaron los anticuerpos quiméricos purificados por FPLC de la enseñanza para determinar su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra células KATO-III que expresan endógenamente CLD 18A2 humano.

50 La sangre humana procedente de donantes sanos se diluyó dos veces en regulador fosfato (PBS) y las células sanguíneas se colocaron en capas sobre Ficoll (1077 g/ml, Pharmacia). Después de la centrifugación, se recogieron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de la interfase, se lavaron y se resuspendieron en medio de cultivo X-Vivo-15 suplementado con suero humano inactivado por calor al 5%. 15 h antes del ensayo, las células KATO-III se transfectaron con luciferasa y se sembraron a 5 x 10⁴ células/pozo en una microplaca blanca.

55 Para el ensayo, se añadieron células efectoras (PBMC, preparadas como se ha descrito anteriormente) a una relación efector a blanco (E:T) de 20:1 y anticuerpos quiméricos purificados con FPLC y se incubaron durante 2-3 h a 37°C, 5% de CO₂. La concentración final del anticuerpo en el pozo fue de 50 µg/ml. Después de 2-3 horas de preincubación, se añadió amarillo de lucifer (BD Biosciences, San José, Estados Unidos) a 1 mg/ml. La luminiscencia resultante de la oxidación del lucifer amarillo por la luciferasa de células viables se midió continuamente hasta 6 h usando un lector de microplacas (Infinite200, Tecan, Suiza). El porcentaje de citotoxicidad celular se calculó usando la siguiente fórmula: % de lisis específica = 100-((recuentos de luminiscencia de la muestra - conteos luminescentes

espontáneos)/(recuentos máximos de luminiscencia - conteos luminescentes espontáneos) x 100), con la luminiscencia espontánea determinada añadiendo Triton X-100 (concentración final del 0.2%), y la señal máxima medida en ausencia de anticuerpos.

5 Usando este ensayo se demostró que los anticuerpos monoclonales ch-163E12 y ch-175D10 median ADCC fuerte en células KATO-III (Figura 33).

f. Inhibición de la proliferación

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

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

10. Selección de anticuerpos como candidatos clínicos principales

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

20 Los anticuerpos proporcionados de acuerdo con la presente enseñanza pueden clasificarse en clases distintas de acuerdo con sus propiedades de unión y su capacidad para mediar funciones efectoras en células que expresan CLD18. A partir de los anticuerpos proporcionados de acuerdo con la presente enseñanza, los candidatos clínicos de plomo se pueden seleccionar basándose en sus características funcionales. Un resumen de las propiedades de los anticuerpos murinos y quiméricos seleccionados de la enseñanza se da en Tab. 5 y Tab. 6, respectivamente.

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

30 a) unión a CLD18A2 humano pero no a CLD18A1 humano (por ejemplo 43A11, 45C1, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-43A11, ch-45C1, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10). Por ejemplo, véanse las figuras 6A y 6B.

b) unión a CLD18A2 de ratón pero no a CLD18A1 de ratón (por ejemplo, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Por ejemplo, véanse las figuras 15A y 15B.

c) unión a CLD18 expresado naturalmente por células tumorales (por ejemplo 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10, y ch-45C1, ch-43A11, ch-125E1, ch-163E12, ch-166E2 y ch-175D10). Por ejemplo, véase la figura 13

35 d) unión a CLD18 en zonas de contacto intercelular (por ejemplo, 45C1, 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Por ejemplo, véanse las figuras 12A y 12B.

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

40 f) mediación la muerte de células inducida por ADCC que expresan CLD18 (por ejemplo, ch-163E12 y ch-175D10). Para ejemplos, véase la figura 33.

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

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

45 i) prolongación de la supervivencia en modelos de xenoinjerto con células que expresan CLD18 (por ejemplo 43A11, 125E1, 163E12, 166E2 y 175D10). Por ejemplo, véase la figura 25B.

Vista general de ejemplo de propiedades para selección de candidatos principales

Tabla 5. Anticuerpos murinos

Anticuerpo	Unión de CLD18A2 humano pero no A1	Unión de CLD18A2 de ratón pero no A1	Unión de CLD18 sobre células tumorales que se expresan de forma natural	Unión a CLD18 en zonas de contacto	Mediación de CDC en células que expresan CLD18	Inhibición de la proliferación de células que expresan CLD18	Inhibición del crecimiento tumoral en el xenoinjerto que expresa CLD18	Prolongación de la supervivencia en el xenoinjerto que expresa CLD18
45C1	+	-	+	+	(+)	+	(+)	(+)
125E1	+	+	+	+	(+)	+	+	+
163E12	+	+	+	+	+	+	+	+
175D10	+	+	+	+	(+)	(+)	+	+
Leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes configuraciones.								

Tabla 6. Anticuerpos quiméricos

Anticuerpo	Unión de CLD18A2 humano pero no A1	Unión de CLD18 sobre células tumorales que expresan de forma natural	Mediación CDC en células que expresan CLD18	Mediación de ADCC en células que expresan CLD18	Inhibición la proliferación de células que expresan CLD18
ch-45C1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-125E1	+	+	n.d.	n.d.	n.d.
ch-163E12	+	+	+	+	+
ch-175D10	+	+	+	+	n.d.
Leyenda: + rendimiento excelente, (+) rendimiento en diferentes configuraciones, n.d. No hecho					

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Astellas Pharma Inc., et al.

5 <120> Anticuerpos monoclonales contra la claudina-18 para el tratamiento de cáncer

<130> 342-31 PCTEPT7

<150> EP 05 025 657.7

<151> 2005-11-24

<160> 150

10 <170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15 <400> 1

ES 2 905 951 T3

```

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

```

<210> 2

<211> 261

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

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

```

ES 2 905 951 T3

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

<210> 3

<211> 816

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 3

ES 2 905 951 T3

```

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

```

<210> 4

<211> 271

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

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

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

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

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

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

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

```


ES 2 905 951 T3

100 105 110

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5

<211> 813

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 5

atggccgtga ctgcctgtca gggccttggg ttcgtgggtt cactgattgg gattgcgggc 60

atcattgctg ccacctgcat ggaccagtgg agcacccaag acttgtacaa caaccccgta 120

acagctgttt tcaactacca ggggctgtgg cgctcctgtg tccgagagag ctctggcttc 180

accgagtgcc ggggctactt caccctgtac ccatacgacg tgccagacta cgcactgggg 240

ctgccagcca tgctgcaggc agtgcgagcc ctgatgatcg taggcatcgt cctgggtgcc 300

attggcctcc tggatatccat ctttgcctg aaatgcatcc gcattggcag catggaggac 360

tctgccaaag ccaacatgac actgacctcc gggatcatgt tcattgtctc aggtctttgt 420

gcaattgctg gagtgtctgt gtttgccaac atgctgggtga ctaacttctg gatgtccaca 480

gctaacatgt acaccggcat ggggtgggatg gtgcagactg ttcagaccag gtacacattt 540

gggtgcggctc tgttcgtggg ctgggtcgct ggaggcctca cactaattgg ggggtgtgatg 600

atgtgcatcg cctgccgggg cctggcacca gaagaaacca actacaaagc cgtttcttat 660

catgcctcgg gccacagtgt tgctacaag cctggaggct tcaaggccag cactggcttt 720

gggtccaaca ccaaaaacaa gaagatatat gatggagggt cccgcacaga ggacgaggta 780

caatcttata cttccaagca cgactatgtg taa 813

ES 2 905 951 T3

<210> 6

<211> 270

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5 <400> 6

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

<210> 7

<211> 786

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 7

atgtccacca ccacatgcca agtgggtggcg ttcctcctgt ccatcctggg gctggccggc	60
tgcatacgcg ccaccgggat ggacatgtgg agcaccagg acctgtacga caaccgcgtc	120
acctccgtgt tccagtacga agggctctgg aggagctgcg tgaggcagag ttcaggcttc	180
accgaatgca ggcctatatt caccatcctg ggacttccag ccatgctgca ggcagtgcga	240
gccctgatga tcgtaggcat cgtcctgggt gccattggcc tcctggatc catctttgcc	300
ctgaaatgca tccgcattgg cagcatggag gactctgcca aagccaacat gacactgacc	360
tccgggatca tgttcattgt ctcaggctct tgtgcaattg ctggagtgtc tgtgtttgcc	420
aacatgctgg tgactaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacaccgg catgggtggg	480
atggtgcaga ctgttcagac cagggtacaca tttggtgcgg ctctgttcgt gggctgggtc	540
gctggaggcc tcacactaat tgggggtgtg atgatgtgca tcgcctgccg gggcctggca	600
ccagaagaaa ccaactacaa agccgtttct tatcatgcct caggccacag tgttgcctac	660
aagcctggag gcttcaaggc cagcactggc tttgggtcca acacaaaaa caagaagata	720
tacgatggag gtgcccgcac agaggacgag gtacaatctt atccttccaa gcacgactat	780
gtgtaa	786

5 <210> 8

<211> 261

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys His Asp Tyr Val
260

<210> 9

<211> 795

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 9

ES 2 905 951 T3

```

atggccacca ccacgtgcc a ggtggtaggg cttctcctgt ccctcctggg tctggccggc 60
tgcatagccg ccactgggat ggacatgtgg agcactcaag acctgtatga caaccagtc 120
accgccgtgt tccagtatga agggctctgg aggagtgcg tgcaacagag ctcgggggttc 180
accgagtgcc ggccatactt caccatcctg ggccttcag ccatgctgca agctgtacga 240
gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggta tcctcgtgtc catcttcgcc 300
ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360
tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480
atgggtggca tgggtgcagac cggttcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540
ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600
ggcctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660
gttgccctaca ggcctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720
aagaagatct acgatggggg tgcccgccaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780
tatgactatg tgtag 795

```

<210> 10

<211> 795

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 10

```

atgtcgggtga ccgcctgcc a gggcctgggg tttgtgggtg cactgatcgg gtttgccggc 60
atcattgcag ccacttgatg ggaccagtgg agcaccagc atttatacaa caaccgggtg 120
accgctgtat tcaactacca agggctatgg cggtcatgcg tccgagagag ctctggcttc 180
accgagtgcc gaggctactt caccctgttg ggggtgccag ccatgctgca agctgtacga 240
gccctgatga tcgtgggcat tgttctgggg gtcacggta tcctcgtgtc catcttcgcc 300
ctgaagtgca ttcgcattgg tagcatggat gactctgcca aggccaagat gactctgact 360
tctgggatct tgttcatcat ctccggcatc tgtgcaatca ttggtgtgtc tgtgtttgcc 420
aacatgctgg tgaccaactt ctggatgtcc acagctaaca tgtacagcgg catgggcggc 480
atgggtggca tgggtgcagac cggttcagacc aggtacacct ttggtgcagc tctgttcgtg 540
ggctgggttg ctggaggcct caccctgatt gggggagtga tgatgtgcat cgctgccgt 600
ggcctgacac cagatgacag caacttcaaa gctgtgtctt accatgcctc tggccaaaat 660
gttgccctaca ggcctggagg ctttaaggcc agcactggct ttgggtccaa caccagaaac 720
aagaagatct acgatggggg tgcccgccaca gaagacgatg aacagtctca tcctaccaag 780
tatgactatg tgtag 795

```

<210> 11

10 <211> 21

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 11
 tggctctgtg tcgacactgt g 21
 <210> 12
 <211> 21
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 12
 10 ggtgtacatgt tagctgtgga c 21
 <210> 13
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 15 <400> 13
 Met Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro Val Thr Ser
 1 5 10 15
 Val Phe Gln Tyr Glu Gly Leu Trp Arg Ser Cys Val Arg Gln Ser Ser
 20 25 30
 Gly Phe Thr Glu Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
 35 40 45
 .
 Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
 50 55
 <210> 14
 <211> 153
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 14

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 15

<211> 390

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 15

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

<210> 16

<211> 129

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

ES 2 905 951 T3

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

Glu

<210> 17

<211> 411

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

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

<210> 18

<211> 136

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

ES 2 905 951 T3

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

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

Lys Leu Gly Thr Glu Leu Gly Ser Thr Pro Val Trp Trp Asn Ser Ala
35 40 45

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

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

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

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

Ala Ala Ile Gln His Ser Gly Gly Arg Ser Arg Arg Ala Arg Thr Lys
115 120 125

Thr His Leu Arg Arg Gly Ser Glu
130 135

<210> 19

<211> 531

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 19

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt	60
gacgcggccc agccggccag gcgcgccatg gaccagtgga gcacccaaga cttgtacaac	120
aaccccgtaa cagctgtttt caactaccag gggctgtggc gctcctgtgt ccgagagagc	180
tctggcttca ccgagtgccg gggctacttc accctgctgg ggctgccagc catgctgcag	240
gcagtgcgag ccctgatgat cgtaggcata gtcctgggtg ccattggcct cctggtatcc	300
atctttgccc tgaaatgcat ccgcattggc agcatggagg actctgceaa agccaacatg	360
acactgacct ccgggatcat gtccattgtc tcaggtcttt gtgcaattgc tggagtgtct	420
gtgtttgcc aacatgctgg gactaacttc tggatgtcca cagctaacaat gtacaccggc	480
atgggtggga tgggtgcagac tggtcagacc aggtacacat ttggtgcgta g	531

<210> 20

10 <211> 176

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 21

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

<210> 22

<211> 11

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

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

<210> 23

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23
 Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asn Asn Pro Val Thr Ala Val Phe
 1 5 10
 <210> 24
 <211> 12
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 24
 Asp Met Trp Ser Thr Gln Asp Leu Tyr Asp Asn Pro
 1 5 10
 <210> 25
 10 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 25
 Cys Arg Pro Tyr Phe Thr Ile Leu Gly Leu Pro Ala
 1 5 10
 15 <210> 26
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26
 Thr Asn Phe Trp Met Ser Thr Ala Asn Met Tyr Thr Gly
 20 1 5 10
 <210> 27
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 27
 Asp Ser Ala Lys Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly Ile
 1 5 10
 <210> 28
 <211> 55
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 28

ES 2 905 951 T3

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

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

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

Met Leu Gln Ala Val Arg Ala
50 55

<210> 29

<211> 24

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

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

Ala Asn Met Thr Leu Thr Ser Gly
20

<210> 30

<211> 40

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

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

Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
35 40

<210> 31

15 <211> 153

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Gly Ala Ala Leu Phe Val Gly Trp
145 150

<210> 32

<211> 3359

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 32

cacaccttcg gcagcaggag ggcggcagct tctcgcaggc ggcagggcgg gcggccagga	60
tcatgtccac caccacatgc caagtgtggtg cgttcctcct gtccatcctg gggctggccg	120
gctgcatcgc ggccaccggg atggacatgt ggagcaccga ggacctgtac gacaaccccg	180
tcacctccgt gttccagtac gaagggctct ggaggagctg cgtgaggcag agttcaggct	240
tcaccgaatg caggccctat ttcaccatcc tgggacttcc agccatgctg caggcagtgc	300
gagccctgat gatcgtaggc atcgtcctgg gtgccattgg cctcctggta tccatctttg	360
ccctgaaatg catccgcatt ggcagcatgg aggactctgc caaagccaac atgacactga	420

ES 2 905 951 T3

cctccgggat catgttcatt gtctcaggtc tttgtgcaat tgctggagtg tctgtgtttg	480
ccaacatgct ggtgactaac ttctggatgt ccacagctaa catgtacacc ggcatgggtg	540
ggatgggtgca gactgttcag accagggtaca catttggtgc ggctctgttc gtgggctggg	600
tcgctggagg cctcacacta attgggggtg tgatgatgtg catcgctgc cggggcctgg	660
caccagaaga aaccaactac aaagccgttt cttatcatgc ctcaggccac agtgttgcct	720
acaagcctgg aggtttcaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaa aacaagaaga	780
tatacgatgg aggtgcccgc acagaggacg aggtacaatc ttatccttcc aagcacgact	840
atgtgtaatg ctctaagacc tctcagcacg gccggaagaa actcccgag agctcaccca	900
aaaaacaagg agatcccatc tagatttctt cttgcttttg actcacagct ggaagttaga	960
aaagcctcga tttcatcttt ggagaggcca aatgggtcta gcctcagtct ctgtctctaa	1020
atattccacc ataaaacagc tgagttattt atgaattaga ggctatagct cacattttca	1080
atcctctatt tcttttttta aatataactt tctactctga tgagagaatg tggttttaat	1140
ctctctctca cattttgatg atttagacag actccccctc ttctctctag tcaataaacc	1200
cattgatgat ctatttccca gcttatcccc aagaaaactt ttgaaaggaa agagtagacc	1260
caaagatgtt attttctgct gtttgaattt tgtctcccca cccccaactt ggctagtaat	1320
aaacacttac tgaagaagaa gcaataagag aaagatattt gtaatctctc cagcccatga	1380
tctcggtttt cttacactgt gatcttaaaa gttaccaaac caaagtcatt ttcagtttga	1440
ggcaacaaaa cttttctact gctgttgaca tcttcttatt acagcaacac cattctagga	1500
gtttcctgag ctctccactg gagtcctctt tctgtcggg gtcagaaatt gtccttagat	1560
gaatgagaaa attatttttt ttaatttaag tcctaaatat agttaaaata aataatgttt	1620
tagtaaaatg atacactatc tctgtgaat agcctcacc ctacatgtgg atagaaggaa	1680
atgaaaaaat aattgctttg acattgtcta tatggtaact tgtaaaagtc tgcttaagta	1740
caaattccat gaaaagctca ctgacctaata ttctttccct ttgaggctc tatggctctg	1800
attgtacatg atagtaagt taagccatgt aaaaagttaa taatgtctgg gcacagtggc	1860
tcacgcctgt aatcctagca ctttgggagg ctgaggagga aggatcactt gagcccagaa	1920
gttcgagact agcctgggca acatggagaa gccctgtctc tacaaaaaac agagagaaaa	1980
aatcagccag tcatggtggc ctacacctgt agtcccagca ttccgggagg ctgagggtggg	2040
aggatcactt gagcccaggg aggttggggc tgcagtgagc catgatcaca cactgcact	2100
ccagccaggt gacatagcga gatcctgtct aaaaaataa aaaaataata atggaacaca	2160
gcaagtctta ggaagtaggt taaaactaat tctttaaaaa aaaaaaaaag ttgagcctga	2220
attaaatgta atgtttccaa gtgacaggta tccacatttg catgggtaca agccactgcc	2280
agtttagcagt agcactttcc tggcactgtg gtcggttttg ttttgttttg ctttgtttag	2340

ES 2 905 951 T3

```

agacgggggc tcactttcca ggctggcctc aaactcctgc actcaagcaa ttcttctacc 2400
ctggcctccc aagtagctgg aattacaggt gtgcgccatc acaactagct ggtggtcagt 2460
tttgttactc tgagagctgt tcacttctct gaattcacct agagtgggtg gaccatcaga 2520
tgtttgggca aaactgaaag ctctttgcaa ccacacacct tccctgagct tacatcactg 2580
cccttttgag cagaaagtct aaattccttc caagacagta gaattccatc ccagtaccaa 2640
agccagatag gccccctagg aaactgaggt aagagcagtc tctaaaaact acccacagca 2700
gcattgggtg aggggaactt ggccattagg ttattatttg agaggaaagt cctcacatca 2760
atagtacata tgaaagtgac ctccaagggg attggtgaat actcataagg atcttcaggc 2820
tgaacagact atgtctgggg aaagaacgga ttatgcccc ttaaataaca agttgtgttc 2880
aagagtcaga gcagtgagct cagaggccct tctcactgag acagcaacat ttaaaccaaa 2940
ccagaggaag tatttgtgga actcactgcc tcagtttggg taaaggatga gcagacaagt 3000
caactaaaga aaaaagaaaa gcaaggagga gggttgagca atctagagca tggagtttgt 3060
taagtgtctc ctggatttga gttgaagagc atccatttga gttgaaggcc acagggcaca 3120
atgagctctc ctttctacca ccagaaagtc cctggtcagg tctcaggtag tgcggtgtgg 3180
ctcagctggg tttttaatta gcgcattctc tatccaacat ttaattgttt gaaagcctcc 3240
atatagttag attgtgcttt gtaattttgt tgttgttgc ctatcttatt gtatatgcat 3300
tgagtattaa cctgaatgtt ttgttactta aatattaaaa acactgttat cctacagtt 3359

```

<210> 33

<211> 849

<212> ADN

5 <213> Mus musculus

<400> 33

```

gagaacctgc ctgtctcttg tcctctccat ttgtgtggac tctgtgctcc atcatgtcgg 60
tgaccgcctg ccagggcttg gggtttgtgg tgtcactgat cgggtttgcg ggcatcattg 120
cagccacttg tatggaccag tggagcacc aggatttata caacaacccg gtgaccgctg 180
tattcaacta ccaagggtta tggcgttcat gcgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt 240
gccgaggcta cttcaccctg ttgggggtgc cagccatgct gcaagctgta cgagccctga 300
tgatcgtggg cattgttctg ggggtcatcg gtatcctcgt gtccatcttc gccctgaagt 360
gcattcgcat tggtagcatg gatgactctg ccaaggccaa gatgactctg acttctggga 420
tcttgttcat catctccggc atctgtgcaa tcattggtgt gtctgtgttt gccaacatgc 480
tggtgaccaa cttctggatg tccacagcta acatgtacag cggcatgggc ggcatgggtg 540
gcattggtga gaccgttcag accaggta ca ccttcggtgc agctctgttc gtgggctggg 600
ttgctggagg cctcaccctg attgggggag tgatgatgtg catcgctgc cgtggcctga 660
caccagatga cagcaacttc aaagctgtgt cttaccatgc ctctggccaa aatgttgctt 720
acaggcctgg aggttttaag gccagcactg gctttgggtc caacaccaga aacaagaaga 780
tctacgatgg gggtgcccgc acagaagacg atgaacagtc tcatcctacc aagtatgact 840
atgtgtagt 849

```

<210> 34

10 <211> 3350

ES 2 905 951 T3

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

agaattgcgc tgtccacttg tcgtgtggct ctgtgtcgac actgtgcgcc accatggccg      60
tgactgcctg tcagggcctg gggttcgtgg ttctactgat tgggattgcg ggcattcattg      120
ctgccacctg catggaccag tggagcacc cagacttgta caacaacccc gtaacagctg      180
ttttcaacta ccaggggctg tggcgctcct gtgtccgaga gagctctggc ttcaccgagt      240
gccggggcta cttcaccttg ctggggctgc cagccatgct gcaggcagtg cgagccctga      300
tgatcgtagg catcgtcctg ggtgccattg gcctcctggt atccatcttt gccctgaaat      360
gcatccgcat tggcagcatg gaggactctg ccaaagccaa catgacactg acctccggga      420
tcattgttcat tgtctcaggt ctttgtgcaa ttgctggagt gtctgtgttt gccaacatgc      480
tggtgactaa cttctggatg tccacagcta acatgtacac cggcatgggt gggatgggtgc      540
agactgttca gaccaggtag acatttggtg cggtctgttt cgtgggctgg gtcgctggag      600
gcctcacact aattgggggt gtgatgatgt gcatcgctg ccggggcctg gcaccagaag      660
aaaccaacta caaagccgtt tcttatcatg cctcaggcca cagtgttgcc tacaagcctg      720
gaggcttcaa ggccagcact ggttttgggt ccaacaccaa aaacaagaag atatacgatg      780
gaggtgcccc cacagaggac gagggtacaat cttatccttc caagcacgac tatgtgtaat      840
gctctaagac ctctcagcac gggcggaaga aactcccga gagctcacc aaaaaacaag      900
gagatcccat ctagatttct tcttgctttt gactcacagc tggaagttag aaaagcctcg      960
atttcatctt tggagaggcc aaatggctct agcctcagtc tctgtctcta aatattccac     1020
cataaaacag ctgagttatt tatgaattag aggctatagc tcacattttc aatcctctat     1080
ttcttttttt aaatataact ttctactctg atgagagaat gtggttttaa tctctctctc     1140
acattttgat gatttagaca gactccccct cttctccta gtcaataaac ccattgatga     1200
tctatttccc agcttatccc caagaaaact tttgaaagga aagagtagac ccaaagatgt     1260
tattttctgc tgtttgaatt ttgtctcccc accccaact tggctagtaa taaacactta     1320
ctgaagaaga agcaataaga gaaagatatt tgtaatctct ccagcccatg atctcggttt     1380
tcttacactg tgatcttaaa agttaccaa ccaaagtcat tttcagtttg aggcaaccaa     1440
acctttctac tgctgttgac atcttcttat tacagcaaca ccattctagg agtttctga     1500

```


ES 2 905 951 T3

```

gctctccact ggagtcctct ttctgtcgcg ggtcagaaat tgtccctaga tgaatgagaa 1560
aattatTTTT ttttaatttaa gtccataata tagttaaaat aaataatgtt ttagtaaaat 1620
gatacactat ctctgtgaaa tagcctcacc cctacatgtg gatagaagga aatgaaaaaa 1680
taattgcttt gacattgtct atatggtact ttgtaaagtc atgcttaagt acaaattcca 1740
tgaaaagctc actgataccta attctttccc tttagaggtct ctatggctct gattgtacat 1800
gatagtaagt gtaagccatg taaaaagtaa ataatgtctg ggcacagtgg ctcacgcctg 1860
taatcctagc actttgggag gctgaggagg aaggatcact tgagcccaga agttcgagac 1920
tagcctgggc aacatggaga agccctgtct ctacaaaata cagagagaaa aaatcagcca 1980
gtcatggtgg cctacacctg tagtcccagc attccgggag gctgagggtg gaggatcact 2040
tgagcccagg gaggttgggg ctgcagttag ccatgatcac accactgcac tccagccagg 2100
tgacatagcg agatcctgtc taaaaaata aaaaataaat aatggaacac agcaagtcct 2160
aggaagttagg ttaaaactaa ttctttaaaa aaaaaaaaaa gttgagcctg aattaaatgt 2220
aatgtttcca agtgacaggt atccacattt gcatggttac aagccactgc cagttagcag 2280
tagcactttc ctggcactgt ggtcggtttt gttttgtttt gctttgttta gagacggggt 2340
ctcactttcc aggttggcct caaactcctg cactcaagca attctttctac cctggcctcc 2400
caagtagctg gaattacagg tgtgcgccat cacaactagc tgggtgtcag ttttgttact 2460
ctgagagctg ttcaacttctc tgaattcacc tagagtgggt ggaccatcag atgtttgggc 2520
aaaactgaaa gctcttttga accacacacc ttccctgagc ttacatcact gcccttttga 2580
gcagaaagtc taaattcctt ccaagacagt agaattccat cccagtacca aagccagata 2640
ggccccctag gaaactgagg taagagcagt ctctaaaaac taccacagc agcattggtg 2700
caggggaact tggccattag gttattattt gagaggaaag tcctcacatc aatagtacat 2760
atgaaagtga cctccaaggg gattggtgaa tactcataag gatcttcagg ctgaacagac 2820
tatgtctggg gaaagaacgg attatgcccc attaaataac aagttgtgtt caagagtcag 2880
agcagtgagc tcagaggccc ttctcactga gacagcaaca tttaaaccac accagaggaa 2940
gtatttgtgg aactcactgc ctgagtttgg gtaaaggatg agcagacaag tcaactaaag 3000
aaaaaagaaa agcaaggagg aggggtgagc aatctagagc atggagtgtt ttaagtgtc 3060
tctggatttg agttgaagag catccatttg agttgaaggc cacagggcac aatgagctct 3120
cccttctacc accagaaagt ccctggtcag gtctcaggta gtgcggtgtg gctcagctgg 3180
gtttttaatt agcgcattct ctatccaaca ttttaattgtt tgaaagcctc catatagtta 3240
gattgtgctt tgtaattttg ttgttgttgc tctatcttat tgtatatgca ttgagtatta 3300
acctgaatgt ttgttactt aaatattaaa aacactgtta tcctacagtt 3350

```

<210> 35

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 35

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

His Pro Thr Lys Tyr Asp Tyr Val
260

<210> 36

<211> 2786

5 <212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 36

ES 2 905 951 T3

ggccgggaac cttcccagca agaggggtgt ggttgctcct ggaagcctgc gcccagcagc	60
tgaagccatg gccaccacca cgtgccaggt ggtagggctt ctctgtccc tcctgggtct	120
ggccggctgc atagccgcca ctgggatgga catgtggagc actcaagacc tgtatgacaa	180
cccagtcacc gccgtgttcc agtatgaagg gctctggagg agttgcgtgc aacagagctc	240
ggggttcacc gagtgccggc catacttcac catcctgggc cttccagcca tgctgcaagc	300
tgtacgagcc ctgatgatcg tgggcattgt tctgggggtc atcggtatcc tcgtgtccat	360
cttcgccctg aagtgcattc gcattggtag catggatgac tctgccaagg ccaagatgac	420
tctgacttct gggatcttgt tcatcatctc cggcactctg gcaatcattg gtgtgtctgt	480
gtttgccaac atgctgggtga ccaacttctg gatgtccaca gctaactgt acagcggcat	540
ggcgcccatg ggtggcatgg tgcagaccgt tcagaccagg tacaccttcg gtgcagctct	600
gttcgtgggc tgggttgctg gaggcctcac cctgattggg ggagtgatga tgtgcatcgc	660
ctgccgtggc ctgacaccag atgacagcaa cttcaaagct gtgtcttacc atgcctctgg	720
ccaaaatgtt gcctacaggc ctggaggctt taaggccagc actggctttg ggtccaacac	780
cagaaacaag aagatctacg atgggggtgc ccgcacagaa gacgatgaac agtctcatcc	840
taccaagtat gactatgtgt agtgtcttaa gacctgcaa cctgtgtgca ggaggaaccc	900
ttccccaaga agagctcacc ccaaagcaac gggagtctac cttgttcctt tgttgatttc	960
aactgacatc tgaagtttg taaagcctga ttttcatcca tagggaggct agacagtctt	1020
ggccacatgt gtctgcctct aaatatccca tcacaaaaca gctgagttat cgtttatgag	1080
ttagaggcca taacactcac tttagcccaa ccctctgctt tttaccgtag actttctttt	1140
catctggtga tggaatggaa tttgactcac agactaatac tttaatggtt tagagaaact	1200
ttccttcctc gtacttaata agcctgtga tggctgattt tccagcttga ccaccaaggg	1260
aaattttaaa aggaaaaaaa aatacattaa aaggcattat ttcctactca attgtgcctt	1320
accccccccc aacttgactg ataataataa tgaacaccac ttaaagaaag aatgccagag	1380
gaaagatagt tgtgtttccc cccagccagt catctgagtc ccctatgtg gtgatctaga	1440

ES 2 905 951 T3

```

acattactcg ccacagtgat tttaaagaa ggcaagcgag cctgttcgct ctgctcagca 1500
tctgctgatt ccagcaaggc ccttccagag ctttccacta gaagtcctcc ttctctcgga 1560
agtcagaaat tccccctaga agagtaagaa atagattcct ttgggtaacc tgagtcctag 1620
gtatagtatt aataaatagt atattagcaa aacggtttgg tatctcagtg aattagtttc 1680
agccttacat atagaaaaag ctggggaaaa aaaaagcatc ccttgacatt gtctatagcg 1740
taagatccta tataaatcca agcttcaaca aaagtcact gagtctaata gttttctttt 1800
gaggtctcca cggccttagt actcatagat gcagcccctg tttaaagta aaaaaattaa 1860
agtagcttaa aacgggttct tttttttttt ttttttttca aaaaatccaa tagagacctg 1920
tgtgtctggc atagctacag ttactgcaa tcgacagggc cacttctttg gtcctgtagg 1980
cagttttgca gttctgacag ctgcgcggg catcaatatg cagaccacac ccttctctgt 2040
gcttgtagga cgaccgctc aaggagaaag catgaactcc atctccatgt gagcctgaat 2100
gctcccagga aatggagata ggggtgcttc caaaacccac ctgaacctga aacagctgta 2160
gcgctatgct gtaagagcct ggccatcaag ttcctatgga gaaaaagggc agtccttgca 2220
ttaatagtgc atatataagt ggccctctggg gggcagggat gaatattcag tggtggtcc 2280
gagtatgtac agaccgtcta aggagctgtg ttgaccaaga gccagggttaa tacgcagagt 2340
ttttccact gggactacag tgattttaga ctatactgaa gaaggccctc tggaaaatca 2400
ttatctgaaa tggcataaag aatgaacaga ccaaacaatt taaggggagg gggcaggtgg 2460
aaggaggggg aaggaggtag aaataagaat ctagggcag aagattgtta aggttcttgg 2520
ggtccaaatg gaaggtcacc cctttgaggc catggacaca atgcaccca cccctacccc 2580
cacctgccc cccaccagaa agtcctggt cggactggag gcagtgagaa tcagctgttt 2640
tcagttagt ggtctcggtg tagcacctgg ctgtttcaaa gcttccctt gctttgccgt 2700
tttttccgcc attgctgtct tgttttctgt gttattaacc tccatgttt gtacgttaaa 2760
tattaaaaca ctgttaacat ccattc 2786

```

<210> 37

<211> 264

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<400> 37

```

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

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

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

```

ES 2 905 951 T3

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

<210> 38

<211> 40

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 38

gagaggatcc cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac 40

10 <210> 39

<211> 37

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 39

5 gagagcggcc gcctaact ctcccctgtt gaagctc 37

<210> 40

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 40

cgtacggtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccggcat ctgatgagca gttgaaatct 60

ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120

tggaaggtgg ataacgcctt ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180

agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240

aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaag 300

agcttcaaca ggggagagtg ttag 324

<210> 41

15 <211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

20 <400> 41

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

ES 2 905 951 T3

—

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 42

<211> 34

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 42

gagaaagctt tccaccaagg gcccatcggt cttc 34

10 <210> 43

<211> 36

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 43

gagagcggcc gctcatttac ccggagacag ggagag 36

<210> 44

<211> 21

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 44

25 taccagttga acttgacctc a 21

<210> 45

<211> 981

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 4

```

ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc    60
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctgt gaactcaggc    120
gccctgacca gggcggtgca cacttccccg gctgtcttac agtcctcagg actctactcc    180
ctcagcagcg tggtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac    240
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagccaa atcttgtgac    300
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc    360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc    420
gtgggtgggg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc    480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt    540
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc    600
aaggctctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg    660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac    720
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg    780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac    840
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac    900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc    960
tcctgtctc cggtaaatg a                                         981

```

<210> 46

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 46

```

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
1           5           10          15

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
          20          25          30

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
          35          40          45

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
          50          55          60

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
65          70          75          80

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
          85          90          95

```

10

ES 2 905 951 T3

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
100 105 110

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
115 120 125

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
130 135 140

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145 150 155 160

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
165 170 175

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
180 185 190

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
195 200 205

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
210 215 220

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
225 230 235 240

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
245 250 255

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
260 265 270

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
275 280 285

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
290 295 300

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
305 310 315 320

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325

<210> 47

<211> 32

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<220>

<221> características_misc

10 <222> (31)..(32)

<223> n es a, c, g, o t

<400> 47
 tttttttt tttttttt tttttttt nn 32
 <210> 48
 <211> 30
 5 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 48
 10 aagcagtggt atcaacgcag agtacgcggg 30
 <210> 49
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 49
 ctgctcactg gatggtggga agatgg 26
 <210> 50
 20 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 25 <400> 50
 gggacagtca ctgagctgct cagag 25
 <210> 51
 <211> 25
 <212> ADN
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 51
 acaggggccca gtggatagac cgatg 25
 35 <210> 52
 <211> 27
 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 52

5 agccagggac caagggatag acagatg 27

<210> 53

<211> 45

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 53

gtaatacgac tcactatagg gcaagcagtg gtatcaacgc agagt 45

<210> 54

15 <211> 22

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

20 <400> 54

gtaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 55

<211> 351

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 55

cagggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagata 60

tcttgcaagg ctactggcta cacattcagt agctactgga tagagtgggt aaagcagagg 120

cctggacatg gccttgagtg gattggagag attttacctg gaagtggtag tactaactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagata catcctccaa cacagcctac 240

atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtgc aagatatgat 300

taccctgtgt ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

30 <210> 56

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 56

cagatccagt	tggtgcagtc	tggaacctgag	ctgaagaagc	ctggagagac	agtcaagatc	60
tcctgcaagg	cttctgggta	taccttcaca	aactatggaa	tgaactgggt	gaagcaggct	120
ccaggaaagg	gtttaaagtg	gatgggctgg	ataaacacca	acactggaga	gccaacatat	180
gctgaagagt	tcaagggacg	gtttgccttc	tctttggaaa	cctctgccag	cactgcctat	240
ttgcagatca	acaacctcaa	aatgaggac	acggctacat	atttctgtgc	aagactgggt	300
5 tttggtaatg	ctatggacta	ctggggctcaa	ggaacctcag	tcacctcttc	ctca	354

<210> 57

<211> 348

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 57

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

<210> 58

15 <211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

20 <400> 58

caggtccaac	tgacgcagcc	tggggctgag	ctggtgaggc	ctggggcttc	agtgaagctg	60
tcctgcaagg	cttctggcta	caccttcacc	agctactgga	taaactgggt	gaagcagagg	120
cctggacaag	gccttgagtg	gatcgaaat	atttatcctt	ctgatagtta	tactaactac	180
aatcaaaaagt	tcaaggacaa	ggccacattg	actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	240
atgcagctca	gcagcccgac	atctgaggac	tctgcggtct	attactgtac	aagatcggtg	300
aggggtaact	cctttgacta	ctggggccaa	ggcaccactc	tcacagtctc	ctca	354

<210> 59

<211> 354

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

5 <400> 59

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

<210> 60

<211> 360

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 60

```
cagggttcacc tacaacagtc tggttctgaa ctgaggagtc ctgggtcttc agtaaagctt    60
tcatgcaagg attttgattc agaagtcttc ccttttgctt atatgagttg gattaggcag    120
aagcctgggc atggatttga atggattgga gacatactcc caagtattgg tagaacaatc    180
tatggagaga agtttgagga caaagccaca ctggatgcag acacagtgtc caacacagcc    240
tacttgagac tcaacagtct gacatctgag gactctgcta tctactactg tgcaaggggg    300
gaggggtacg gtgcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctctgca    360
```

15 <210> 61

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 61

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

<210> 62

<211> 318

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 62

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

<210> 63

<211> 321

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 63

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
atcacctgca aggccagtc gaattgttcgt actgctgtag cctgggtatca acagaaacca	120
gggcagtctc cttaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct	240
gaagacctgg cagattattt ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga	300
ggcaccaagc tggaaatcaa a	321

15

<210> 64

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 64

gacattgtga tgtcacagtc tccatctctc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact	60
atgagctgca agtccagtc gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc	120
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tttactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat	300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa	339

<210> 65

<211> 339

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 65

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

<210> 66

10 <211> 336

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

15 <400> 66

gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggctcact	60
atgagctgca aatccagtc gagtctgttc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggct	120
tggtaccagc agaaaccagg gcagctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg	180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc	240
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg	300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaa	336

<210> 67

<211> 339

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 67

ES 2 905 951 T3

gacatcgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaagggtact 60
atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg caacagattt cactctgacc 240
atcagcagtg tgcaggctga agaccttgca gattatcact gtggacaggg ttacagctat 300
ccgtacacgt tcggaggggg ,gaccaagctg gaaataaaa 339

<210> 68

<211> 339

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 68

gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaagggtact 60
atgagctgca agtccagtca gagcctttta tatagtagca atcaaaagaa ctacttggcc 120
tgggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga ttactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 300
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaa 339

10 <210> 69

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: producto de PCR

<400> 69

aacattgtaa tgacccaatc tcccaaatcc atgtccatgt cagtaggaga gagggtcacc 60
ttgacctgca aggccagtga gaatgtggtt acttatgttt cctgggtatca acagaaacca 120
gagcagcttc ctaaactgct gatatacggg gcatccaacc ggtacactgg ggtccccgat 180
cgcttcacag gcagtggatc tgcaacagat ttcactctca ccatcagcag tgtgaaggct 240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgctcac gttcgggtgct 300
gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 70

<211> 43

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 70
gagaaagctt gccgccacca tggaatggac ctgggtcttt ctc 43
<210> 71
<211> 43
5 <212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
<400> 71
10 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtc 43
<210> 72
<211> 47
<212> ADN
<213> Artificial
15 <220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
<400> 72
gagaaagctt gccgccacca tggattggct gtggaacttg ctattcc 47
<210> 73
20 <211> 44
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
25 <400> 73
gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gttc 44
<210> 74
<211> 46
<212> ADN
30 <213> Artificial
<220>
<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
<400> 74
gagaaagctt gccgccacca tggaatggat ctggatcttt ctcttc 46
35 <210> 75
<211> 44
<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 75

5 gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtgc 44

<210> 76

<211> 46

<212> ADN

<213> Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 76

gagaaagctt gccgccacca tgggatggag ctgtatcatc ctcttc 46

<210> 77

15 <211> 43

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

20 <400> 77

gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac tgtgagagtg gtg 43

<210> 78

<211> 47

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 78

gagaaagctt gccgccacca tggaatggag gatctttctc ttcattc 47

30 <210> 79

<211> 44

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 79

gagagggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgactgag gtgc 44

<210> 80
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 80
 gagaggtctc aagcttagcc accatggact ggatttggat catgctccat c 51
 <210> 81
 10 <211> 44
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 15 <400> 81
 gagagggccc ttggtggagg ctgcagagac agtgaccaga gtcc 44
 <210> 82
 <211> 43
 <212> ADN
 20 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 82
 gagaaagctt gccgccacca tggaatcaca gactcaggtc ctc 43
 25 <210> 83
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 83
 cacacgtacg tttagctcc agcttgggtcc cagc 34
 <210> 84
 <211> 46
 35 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 84
 gagaaagctt gccgccacca tgcattttca agtgcagatt ttcagc 46
 <210> 85
 5 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 10 <400> 85
 cacacgtacg ttttatttc agcttggtcc 30
 <210> 86
 <211> 44
 <212> ADN
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 86
 gagaaagctt gccgccacca tggagtttca gacccaggctc ttg 44
 20 <210> 87
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 25 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 87
 cacacgtacg ttgatttcc agcttggtgc ctc 33
 <210> 88
 <211> 46
 30 <212> ADN
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido
 <400> 88
 35 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccagggtt cttatg 46
 <210> 89
 <211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

5 <400> 89

cacacgtacg tttagctcc agcttggtcc 30

<210> 90

<211> 46

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 90

gagaaagctt gccgccacca tggaatcaca gactcaggtc ctcattg 46

15 <210> 91

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 91

cacacgtacg tttatttcc aactttgtcc 30

<210> 92

<211> 49

25 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 92

30 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccaggtt ctatattg 49

<210> 93

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

35 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 93

cacacgtacg tttatttcc agcttggtcc 30

<210> 94

<211> 46

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 94

gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggcccagggt cttatg 46

10 <210> 95

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 95

cacacgtacg tttatttcc agcttggtcc 30

<210> 96

<211> 46

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 96

25 gagaaagctt gccgccacca tggattcaca ggctcagggt cttatg 46

<210> 97

<211> 33

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 97

cacacgtacg ttccagctcc agcttggtcc cag 33

<210> 98

35 <211> 41

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 98

gagaaagctt agccacatg gaatcacaga ctctggtctt c 41

5 <210> 99

<211> 30

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 99

cacacgtacg ttccagctcc agcttggtcc 30

<210> 100

<211> 1401

15 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 100

atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcagggtg ccactcccag	60
gttcagctgc agcagctctg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc	120
tgcaaggcta ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct	180
ggacatggcc ttgagtggat tggagagatt ttacctggaa gtggtagtac taactacaat	240
gagaagtcca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg	300
caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag atatgattac	360
ccctgggttg cttactgggg ccaagggact ctggctcactg tctctgcagc ctccaccaag	420
ggcccatcgg tcttccccct ggcacccctc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	480
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	540
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	600
ctcagcagcg tggtagaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac	660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggtg gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac	720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc	780
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	840
gtgggtggtg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggtg cgtggacggc	900
gtggagggtg ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	960
gtggctcagc tcctcaccgt cctgcaccag gactgggtga atggcaagga gtacaagtgc	1020
aaggctctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccattctcaa agccaaaggg	1080

20

ES 2 905 951 T3

cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatcccc gggatgagct gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgctgt ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tcctgtctc cgggtaaatg a 1401

<210> 101

<211> 1404

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 101

atggattggc tgtggaactt gctattcctg atggcagctg cccaaagtat ccaagcacag 60
atccagttgg tgcagtctgg acctgagctg aagaagcctg gagagacagt caagatctcc 120
tgcaaggcct ctgggtatac cttcacaac tatggaatga actgggtgaa gcaggctcca 180
ggaaagggtt taaagtggat gggctggata aacaccaaca ctggagagcc aacatatgct 240
gaagagtcca agggacggtt tgccttctct ttggaaacct ctgccagcac tgcctatttg 300
cagatcaaca acctcaaaaa tggagacacg gctacatatt tctgtgcaag actgggtttt 360
ggtaatgcta tggactactg gggtaagga acctcagtc cgtctctctc agcctccacc 420
aagggcccat cggctctccc cctggcacc tctccaaga gcacctctgg gggcacagcg 480
gccctgggct gcctgggtcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacggtgtc gtggaactca 540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggtgttcc tacagtcctc aggactctac 600
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcacccagac ctacatctgc 660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt 720
gacaaaactc acacatgccc accgtgccc gcacctgaac tcttgggggg accgtcagtc 780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca 840
tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac 900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 960
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 1020
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag 1140
aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgggag 1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gctggactcc 1260

gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg 1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga 1404

10

<210> 102

<211> 1398

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 102

```

atggaatgga tctggatctt tctcttcac cttctcaggaa ctgcaggtgt ccactcccag    60
gttcagctgc agcagctctgg agctgagctg gcgaggcccg gggcttcagt gaagctgtcc    120
tgcaaggctt ctggctacac cttcactgac tactatataa actgggtgaa gcagaggact    180
ggacagggcc ttgagtggat tggagagatt tatcctggaa gtggtaatac ttactacaat    240
gagaagtcca agggcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg    300
cagctcagca gcttgacatc tgaggactct gcagtctatt tctgtgcaag atcgtatggt    360
gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctcagcctc caccaagggc    420
ccatcgggtct tccccctggc accctcctcc aagagcacct ctggggggcac agcggccctg    480
ggctgcctgg tcaaggacta cttccccgaa ccggtgacgg tgtcgtggaa ctcaggcgcc    540
ctgaccagcg gcgtgcacac cttccccgct gtctctacagt cctcaggact ctactccctc    600
agcagcgtgg tgaccgtgcc ctccagcagc ttgggcaccc agacctacat ctgcaacgtg    660
aatcacaagc ccagcaacac caaggtggac aagaaagtgg agcccaaadc ttgtgacaaa    720
actcacacat gccaccctg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc    780
ttccccccaa aaccaagga caccctcatg atctccccga cccctgaggt cacatgcgtg    840
gtggtggacg tgagccacga agacctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg    900
gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg gagggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg    960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag   1020
gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag   1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag   1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag   1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc   1260
tcctttcttc tctatagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc   1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc   1380
ctgtctccgg gtaaatga                                     1398

```

<210> 103

<211> 1404

10 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 103

ES 2 905 951 T3

```

atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt ccactcccag    60
gtccaactgc agcagcctgg ggctgagctg gtgaggcctg gggcttcagt gaagctgtcc    120
tgcaaggcct ctggctacac cttcaccagc tactggataa actgggtgaa gcagaggcct    180
ggacaaggcc ttgagtggat cggaaatatt tatccttctg atagttatac taactacaat    240
caaaaagttca aggacaaggc cacattgact gtagacaaat cctccagcac agcctacatg    300
cagctcagca gcccgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtacaag atcgtggagg    360
ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtctcttc agcctccacc    420
aagggcccat cggctcttccc cctggcacc cctccaaga gcacctctgg gggcacagcg    480
gccctgggct gcctgggcaa ggactacttc cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca    540
ggcgccctga ccagcggcgt gcacaccttc ccggctgtcc tacagtcctc aggactctac    600
tcctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc agcagcttgg gcaccagac ctacatctgc    660
aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag gtggacaaga aagttgagcc caaatcttgt    720
gacaaaactc acacatgcc accgtgccca gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc    780
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca    840
tgcgtgggtg tgacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac    900
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac    960
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag   1020
tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa   1080
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag   1140
aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag   1200
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc   1260
gacggctcct tcttctctta tagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg   1320
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc   1380
ctctccctgt ctccgggtaa atga                                           1404

```

<210> 104

<211> 1401

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 104

ES 2 905 951 T3

```

atggaatgga ggatctttct cttcatctcg tcaggaactg cagggtgtcca ctcccagggt 60
cagctgcagc agtctggacc tgagctgggt aagcctgggg cttcagtga gatgtcctgc 120
aaggcttctg gatacacatt cactgactat gttataagct gggatgaagca gagaactgga 180
cagggccttg agtggattgg agagatttat cctggaagt gtagtactta ctacaatgag 240
aagttcaagg gcaaggccac actgactgca gacaaatcct ccaacacagc ctacatgcag 300
ctcagcagcc tgacatctga ggactctgcg gtctatttct gtgcaagagg ggtattacta 360
cgggctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 420
ggcccatcgg tcttccccct ggcacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc 480
ctgggctgcc tggatcaagg ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgt gaactcaggc 540
gccctgacca gggcggtgca cacttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 600
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac 660
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaag ttgagcccaa atcttgtgac 720
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc 780
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc 840
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc 900
gtggagggtc ataagccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt 960
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc 1020
aaggctctca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg 1080
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac 1140
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg 1200
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac 1260
ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac 1320
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc 1380
tccctgtctc cgggtaaatg a 1401

```

<210> 105

<211> 1410

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220 >

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 105

```

atggactgga tttggatcat gctccatctg ctggcagcag ctacagggtat ccaatcccag 60

```

ES 2 905 951 T3

```

gttcacctac aacagtctgg ttctgaactg aggagtcctg ggtcttcagt aaagctttca 120
tgcaaggatt ttgattcaga agtcttcctt tttgcttata tgagttggat taggcagaag 180
cctgggcatg gatttgaatg gattggagac atactcccaa gtattggtag aacaatctat 240
ggagagaagt ttgaggacaa agccacactg gatgcagaca cagtgtccaa cacagcctac 300
ttggagctca acagtctgac atctgaggac tctgctatct actactgtgc aaggggggag 360
ggctacggtg cctgggtttgc ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgcagcc 420
tccaccaagg gcccatcggt cttccccctg gcacctcct ccaagagcac ctctgggggc 480
acagcgcccc tgggctgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcaggcg ccctgaccag cgcgctgcac accttccccg ctgtcctaca gtcctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggcac ccagacctac 660
atctgcaacg tgaatcaca gccccagcaac accaagggtg acaagaaagt tgagcccaaa 720
tcttgtgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg 780
tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag gacacctca tgatctcccg gacctctgag 840
gtcacatgcg tgggtggtgga cgtgagccac gaagacctg aggtcaagtt caactggtac 900
gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc 960
acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc ctgcaccagg actggtgaa tggcaaggag 1020
tacaagtgca aggtctccaa caaagccctc ccagcccca tcgagaaaac catctccaaa 1080
gccaaggggc agccccgaga accacagggtg tacacctgc ccccatcccg ggatgagctg 1140
accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc 1200
gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag aacaactaca agaccacgcc tcccgtgctg 1260
gactccgacg gctccttctt cctctatagc aagctcaccg tggacaagag caggtggcag 1320
caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag 1380
aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 1410

```

<210> 106

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 106

```

atggaatcac agactcaggc cctcatgtcc ctgctgttct gggatatctg tacctgtggg 60
gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga gaaggctact 120
atgagctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 180
tggtagcagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 240

```

ES 2 905 951 T3

```

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggg agtggatctg gaacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 360
ccgctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttggtggtc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcaggggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

<210> 107

<211> 708

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 107

```

atgcattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc 60
agaggacaaa ttgtttctac ccagctctcca gcaatcatgt ctgcatctcc aggggagaag 120
gtcaccataa cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttaca tgcactggtt ccagcagaag 180
ccaggcactt ctcccaaact ctggatttat agcacatcca acctggcttc tggagtccct 240
gctcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttactctc tcacaatcag ccgaatggag 300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag caaaggagta gttaccacc caggttcgga 360
ggggggacca agctggaaat aaaacgtacg gtggctgcac catctgtctt catcttccc 420
ccatctgatg agcagttgaa atctggaact gcctctgttg tgtgcctgct gaataacttc 480
tatcccagag aggccaaagt acagtggaag gtggataacg ccctccaatc gggtaactcc 540
caggagagtg tcacagagca ggacagcaag gacagcacct acagcctcag cagcaccctg 600
acgctgagca aagcagacta cgagaaacac aaagtctacg cctgcgaagt caccatcag 660
ggcctgagct cgcccgtcac aaagagcttc aacaggggag agtggttag 708

```

10 <210> 108

<211> 705

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 108

```

atggagtttc agaccaggt ctttgtattc gtgttgcctc gggtgtctgg tgttgatgga 60

```

ES 2 905 951 T3

```

gacattgtga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120
atcacctgca aggccagtcga gaatgttcgt actgctgtag cctggtatca acagaaacca 180
gggcagtcctc ctaaagcact gatttacttg gcatccaacc ggcacactgg agtccctgat 240
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcaatct 300
gaagacctgg cagattatct ctgtctgcaa cattggaatt atcctctgac gttcgggtgga 360
ggcaccaagc tggaaatcaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcc 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatacgggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

```

<210> 109

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 109

```

atggattcac aggccaggt tcttatgtta ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg 60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctagtgtgt cagttggaga gaagggtact 120
atgagctgca agtccagtcga gagcctttta tatagttagca atcaaaagaa ctacttggcc 180
tggtaccagc agaaaccagg gcagctctct aaactgctga tttactgggc atccactagg 240
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 300
atcagcagtg tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcaata ttatagctat 360
ccgctcacgt tcgggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gtacgggtggc tgcaccatct 420
gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc 480
ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc aaagtacagt ggaagggtgga taacgccctc 540
caatcgggta actcccagga gagtgtcaca gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc 600
ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc 660
gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt 720
tag 723

```

10 <210> 110

<211> 723

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 110

```

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

```

<210> 111

<211> 720

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 111

```

atggattcac agggccaggt tcttatattg ctgctgctat gggatatctgg tacctgtggg    60
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact    120
atgagctgca aatccagtca gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttggtc    180
tggtaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg    240
gaatctgggg tccctgatcg ctccacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc    300
atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaagcaatc ttataatctg    360
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgta cgggtggctgc accatctgtc    420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg    480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa    540
tcgggtaact ccagggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc    600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctcgcgaa    660
gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag    720

```

10 <210> 112

<211> 723

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 112

```

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

```

<210> 113

<211> 723

<212> ADN

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 113

```

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

```

10

<210> 114

<211> 705

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 114

```

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

```

<210> 115

5 <211> 466

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

10 <400> 115

```

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

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
      20              25              30

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

```

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 116

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 116

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

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

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 290 295 300
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 305 310 315 320
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 325 330 335
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 340 345 350
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
 355 360 365
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
 370 375 380
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 385 390 395 400
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
 405 410 415
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
 420 425 430
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
 435 440 445
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
 450 455 460

Pro Gly Lys
465

<210> 117

<211> 465

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 117

Met Glu Trp Ile Trp Ile Phe Leu Phe Ile Leu Ser Gly Thr Ala Gly
 1 5 10 15
 Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg
 20 25 30

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys
465

<210> 118

<211> 467

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 118

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

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
275 280 285

Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
465

<210> 119

<211> 466

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 119

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

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
275 280 285

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
290 295 300

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Lys
465

<210> 120

<211> 469

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 120

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
260 265 270

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
275 280 285

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
290 295 300

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

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
325 330 335

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

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

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

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

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

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

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
435 440 445

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

Leu Ser Pro Gly Lys
465

<210> 121

<211> 240

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 121

ES 2 905 951 T3

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 122

<211> 235

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 122

ES 2 905 951 T3

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

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile
 20 25 30

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

Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Thr Ser
 50 55 60

Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
 65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
 85 90 95

Ser Arg Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg
 100 105 110

Ser Ser Tyr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 115 120 125

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 130 135 140

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 145 150 155 160

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 165 170 175

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 180 185 190

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 195 200 205

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 210 215 220

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 123

<211> 234

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 123

ES 2 905 951 T3

Met Glu Phe Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Val Leu Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn
35 40 45

Val Arg Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Ala Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Asn Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp
100 105 110

Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

-

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 124

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 124

ES 2 905 951 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 125

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 125

ES 2 905 951 T3

Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Leu Met Ser Leu Leu Phe Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr
20 25 30

Val Thr Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 126

<211> 239

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 126

ES 2 905 951 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Ile Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

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

Tyr Cys Lys Gln Ser Tyr Asn Leu Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 127

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 127

ES 2 905 951 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp
85 90 95

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

His Cys Gly Gln Gly Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 128

<211> 240

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 128

ES 2 905 951 T3

Met Asp Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu Leu Trp Val Ser
1 5 10 15

Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
35 40 45

Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
50 55 60

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
65 70 75 80

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
85 90 95

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr
100 105 110

Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
115 120 125

Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe
130 135 140

Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys
145 150 155 160

Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val
165 170 175

Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln
180 185 190

Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser
195 200 205

Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
210 215 220

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235 240

<210> 129

<211> 234

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: anticuerpo monoclonal quimérico

<400> 129

ES 2 905 951 T3

Met Glu Ser Gln Thr Leu Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
1 5 10 15

Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
20 25 30

Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
100 105 110

Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 130

<211> 18

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 130

10 ccaagggcta tggcggtc 18

<210> 131

<211> 18

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: Oligonucleótido

<400> 131

5 ccgaaggtgt acctggtc 18

<210> 132

<211> 117

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

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

<400> 132

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Tyr Asp Tyr Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 133

15 <211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

20 <400> 133

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

ES 2 905 951 T3

Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Asn Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Glu Glu Phe
50 55 60

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Gly Phe Gly Asn Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134

<211> 116

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 134

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

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 135

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

ES 2 905 951 T3

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

<400> 135

```

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

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

Trp Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
          50          55          60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65          70          75          80

Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Thr Arg Ser Trp Arg Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Thr Leu Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 136

5 <211> 118

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

10 <400> 136

```

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

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

Val Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

Gly Glu Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
          50          55          60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65          70          75          80

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

Ala Arg Gly Val Leu Leu Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
          100          105          110

Ser Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 137

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

5 <220>

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

<400> 137

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Asp Phe Asp Ser Glu Val Phe Pro Phe
20 25 30

Ala Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Lys Pro Gly His Gly Phe Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Asp Ile Leu Pro Ser Ile Gly Arg Thr Ile Tyr Gly Glu Lys
50 55 60

Phe Glu Asp Lys Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Val Ser Asn Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Leu Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Glu Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 138

10 <211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

15 <400> 138

ES 2 905 951 T3

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

Lys

<210> 139

<211> 106

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 139

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

10

<210> 140

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 140

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1           5           10           15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
          20           25           30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
          35           40           45

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65           70           75           80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Trp Asn Tyr Pro Leu
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105

```

5 <210> 141

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción de producto de PCR

<400> 141

```

Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
1           5           10           15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
          20           25           30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
          35           40           45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
          50           55           60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65           70           75           80

Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
          85           90           95

Tyr Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
          100          105          110

```

Lys

<210> 142

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: Traducción de producto de PCR

<400> 142

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 143

10 <211> 112

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

15 <400> 143

ES 2 905 951 T3

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

<210> 144

<211> 113

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

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

<400> 144

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

10 Lys

<210> 145

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

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

<400> 145

```

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

```

5 Lys

<210> 146

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

10 <220>

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

<400> 146

```

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

```

<210> 147

<211> 324

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico de codón optimizado

<400> 147

```
cgtacggtgg ccgtcccag cgtgttcac ttcccccca gcgacgagca gctgaagtcc    60
ggcaccgcca gcgtggtgtg cctgctgaac aacttctacc cccgggaggc caaggtgcag    120
tggaaggtgg acaacgccct gcagagcggc aacagccagg agagcgtcac cgagcaggac    180
agcaaggact ccacctacag cctgagcagc accctgaccc tgagcaaggc cgactacgag    240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaggtgacc caccagggcc tgtccagccc cgtgaccaag    300
agcttcaaca ggggcgagtg ctag                                     324
```

<210> 148

<211> 107

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de codón optimizada

<400> 148

```
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1             5             10             15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20             25             30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35             40             45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50             55             60

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

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85             90             95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100             105
```

15

<210> 149

<211> 981

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: ácido nucleico de codón optimizado

<400> 149

ggcccaagcg	tgttccccct	ggccccccagc	agcaagagca	ccagcggcgg	cacagccgcc	60
ctgggctgcc	tggtgaagga	ctacttcccc	gagcccgta	ccgtgagctg	gaacagcgga	120
gccctgacct	ccggcgtgca	caccttcccc	gccgtgctgc	agagcagcgg	cctgtacagc	180
ctgagcagcg	tggtgaccgt	gccagcagc	agcctgggca	cccagacct	catctgcaac	240
gtgaaccaca	agcccagcaa	caccaagggtg	gacaagagag	tggagcccaa	gagctgcgac	300
aagaccaca	cctgcccccc	ctgcccagcc	ccagagctgc	tgggcggacc	cagcgtgttc	360
ctgttcccc	ccaagcccaa	ggacaccctg	atgatcagca	ggacccccga	ggtgacctgc	420
gtggtggtg	acgtgagcca	cgaggacca	gaggtgaagt	tcaactggta	cgtggacggc	480
gtggaggtgc	acaacgcaa	gaccaagccc	agagaggagc	agtacaacag	cacctacagg	540
gtggtgtccg	tgctgaccgt	gctgcaccag	gactggctga	acggcaagga	atacaagtgc	600
aaggtctcca	acaaggccct	gccagcccc	atcgaaaaga	ccatcagcaa	ggccaagggc	660
cagccacggg	agccccaggt	gtacaccctg	ccccccagcc	gggaggagat	gaccaagaac	720
caggtgtccc	tgacctgtct	ggtgaagggc	ttctacccca	gagacatcgc	cgtggagtgg	780
gagagcaacg	gccagcccc	gaacaactac	aagaccaccc	ccccagtgt	ggacagcgac	840
ggcagcttct	tcctgtacag	caagctgacc	gtggacaagt	ccaggtggca	gcagggcaac	900
gtgttcagct	gcagcgtgat	gcacgaggcc	ctgcacaacc	actacacca	gaagtccctg	960
agcctgagcc	ccggcaagta	g				981

<210> 150

5 <211> 326

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Descripción de la secuencia artificial: proteína de codón optimizada

10 <400> 150

ES 2 905 951 T3

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

ES 2 905 951 T3

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 145 150 155 160
 Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 165 170 175
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
 180 185 190
 Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que tiene la capacidad de unirse a CLD18A2 y mediar en la muerte de células que expresan CLD18A2, en el que dicho anticuerpo comprende un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) que comprende un conjunto de regiones determinantes de complementariedad CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas de los siguientes conjuntos (i) a (v):
 - (i) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 115, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 115, CDR3: posiciones 116-125 de la SEQ ID NO: 115, VL: CDR1: posiciones 49-53 de la SEQ ID NO: 122, CDR2: posiciones 71-73 de la SEQ ID NO: 122, CDR3: posiciones 110-118 de la SEQ ID NO: 122,
 - (ii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 116, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 116, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 116, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 121, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 121, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 121,
 - (iii) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 117, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 117, CDR3: posiciones 116-124 de la SEQ ID NO: 117, VL: CDR1: posiciones 47-52 de la SEQ ID NO: 123, CDR2: posiciones 70-72 de la SEQ ID NO: 123, CDR3: posiciones 109-117 de la SEQ ID NO: 123,
 - (iv) VH: CDR1: posiciones 44-51 de la SEQ ID NO: 119, CDR2: posiciones 69-76 de la SEQ ID NO: 119, CDR3: posiciones 115-125 de la SEQ ID NO: 119, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 126, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 126, CDR3: posiciones 115-122 de la SEQ ID NO: 126, y
 - (v) VH: CDR1: posiciones 45-52 de la SEQ ID NO: 118, CDR2: posiciones 70-77 de la SEQ ID NO: 118, CDR3: posiciones 116-126 de la SEQ ID NO: 118, VL: CDR1: posiciones 47-58 de la SEQ ID NO: 125, CDR2: posiciones 76-78 de la SEQ ID NO: 125, CDR3: posiciones 115-123 de la SEQ ID NO: 125,
 en el que los dominios VH y VL del anticuerpo se expresan en una única cadena polipeptídica.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1 que se une a CLD18A1 y CLD18A2 o se une a CLD18A2 pero no a CLD18A1.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1 o 2, que es capaz de unirse a una célula efectora, preferiblemente una célula T.
4. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en una IgG1, una IgG2, preferiblemente IgG2a e IgG2b, una IgG3, una IgG4, una IgM, una IgA1, una IgA2, una IgA secretora, una IgD, un anticuerpo IgE, un anticuerpo biespecífico y un anticuerpo multiespecífico.
5. El anticuerpo de la reivindicación 4, que es un anticuerpo biespecífico o multiespecífico que comprende una primera especificidad de unión por CLD18 y una segunda especificidad de unión por un segundo epítipo diana que es preferentemente un receptor Fc, más preferentemente Fc-gammaRI humano (CD64) o un receptor Fc-alfa humano (CD89), o un receptor de células T, preferiblemente CD3.
6. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que CLD18A2 tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 2.
7. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6 en el que CLD18A1 tiene la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 8.
8. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que se une a los epítopos nativos de CLD18A2 presentes en la superficie de las células vivas.
9. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 que comprende una región variable de cadena pesada (VH) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 132, 133, 134, 135, 136, y un fragmento de la misma.
10. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 que comprende una región variable de cadena ligera (VL) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 138, 139, 140, 142, 143, y un fragmento de la misma.
11. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 que comprende una combinación de región variable de cadena pesada (VH) y región variable de cadena ligera (VL) seleccionada de las siguientes posibilidades (i) a (v):
 - (i) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 132 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 139 o un fragmento de la misma,
 - (ii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 133 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 138 o un fragmento de la misma,
 - (iii) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 134 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 140 o un fragmento de la misma,

- (iv) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 136 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 143 o un fragmento de la misma, and
- 5 (v) la VH comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 135 o un fragmento de la misma y la VL comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 142 o un fragmento de la misma.
12. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 que comprende
- (i) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 115, 116, 117, 118, 119, y un fragmento de la misma
- y/o
- 10 (ii) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEQ ID NO: 121, 122, 123, 125, 126, y un fragmento de la misma.
13. El anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 que comprende una combinación de cadenas pesadas y cadenas ligeras seleccionadas de las siguientes posibilidades (i) a (v):
- 15 (i) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 115 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 122 o un fragmento de la misma,
- (ii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 116 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 121 o un fragmento de la misma,
- 20 (iii) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 117 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 123 o un fragmento de la misma,
- (iv) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 119 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 126 o un
- 25 fragmento de la misma, y
- (v) la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 118 o un fragmento de la misma y la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 125 o un fragmento de la misma.
14. Una célula recombinante que expresa el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13.
- 30 15. Un conjugado que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 acoplado a un agente terapéutico, en el que el agente terapéutico es preferiblemente una toxina, un radioisótopo, un fármaco o un agente citotóxico.
16. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13 y/o un conjugado de la reivindicación 15, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 17. Un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, un conjugado de la reivindicación 15 o una composición farmacéutica de la reivindicación 16, para uso en un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno que involucra células que expresan CLD18A2.
- 40 18. El anticuerpo para uso, conjugado para uso o composición farmacéutica para uso de la reivindicación 17, en el que la enfermedad o trastorno es una enfermedad relacionada con tumores, en el que la enfermedad relacionada con tumores se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer de esófago, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de vesícula biliar, y metástasis de los mismos.

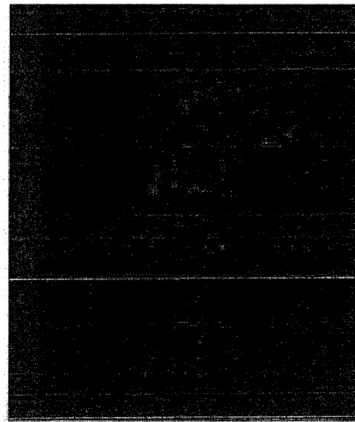
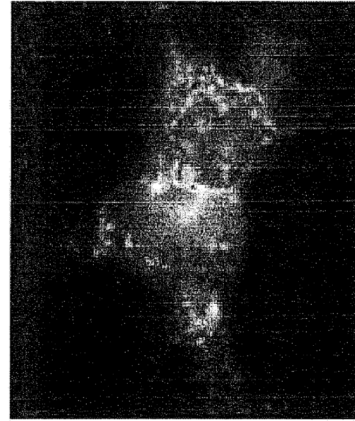
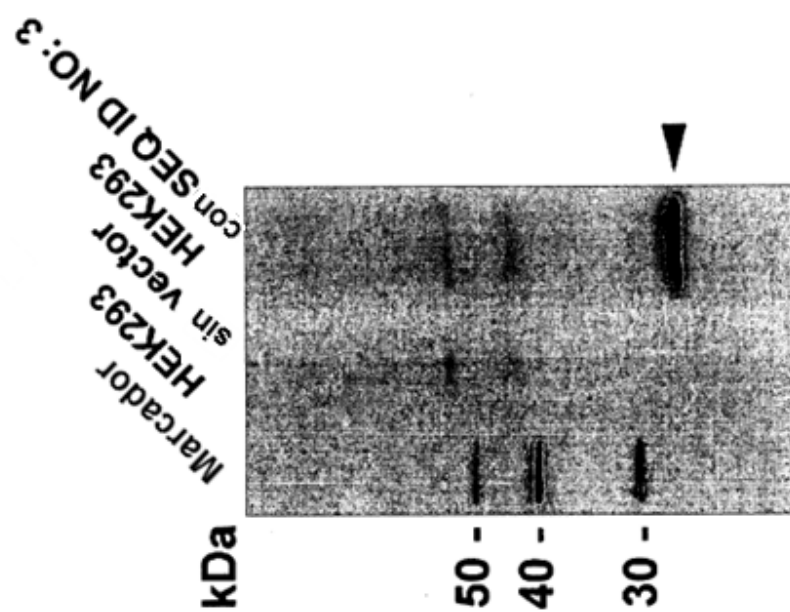


Fig. 1

Fig. 2



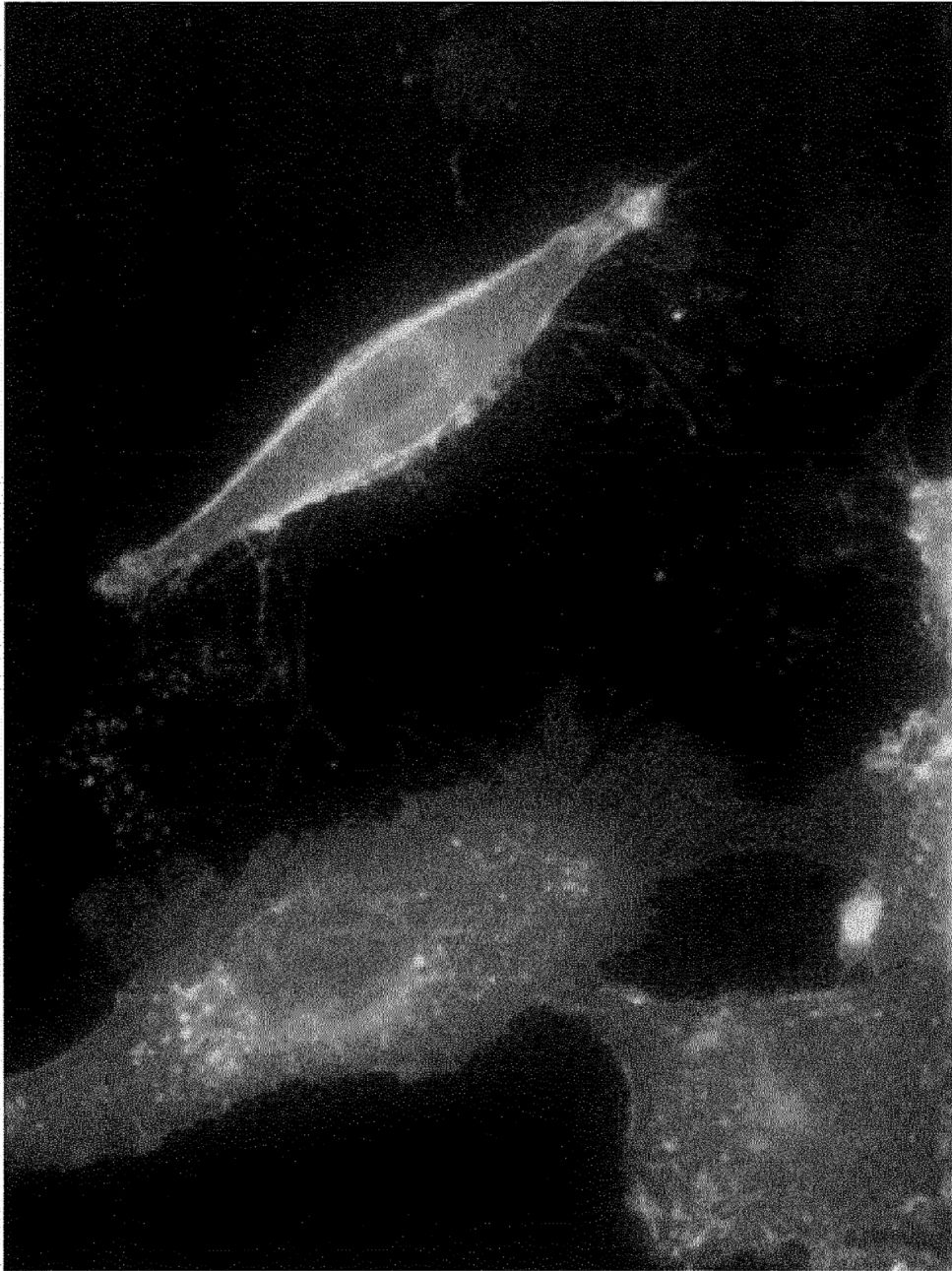


Fig. 3

Fig. 4

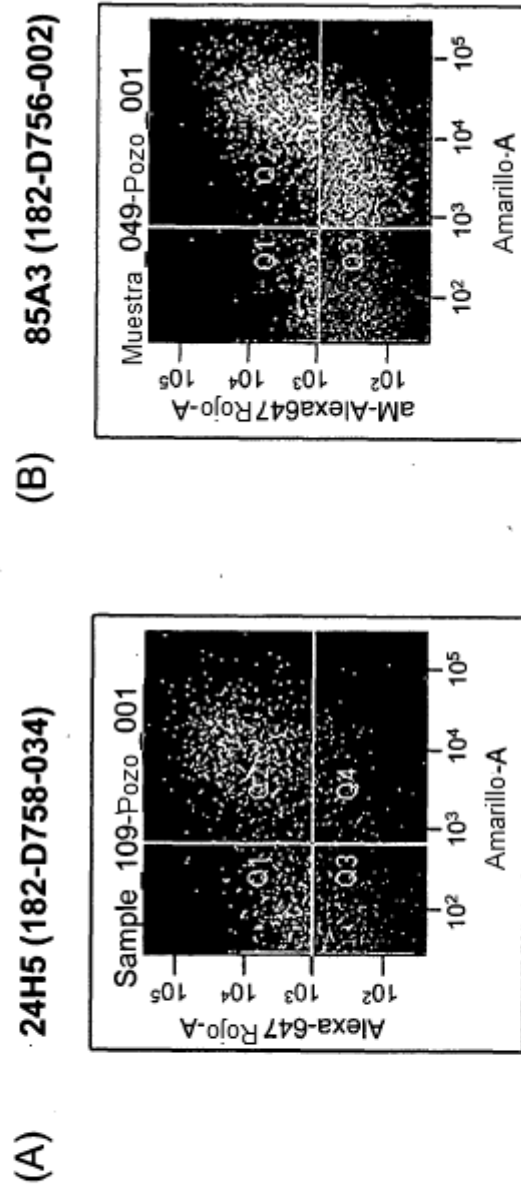


Fig. 4C

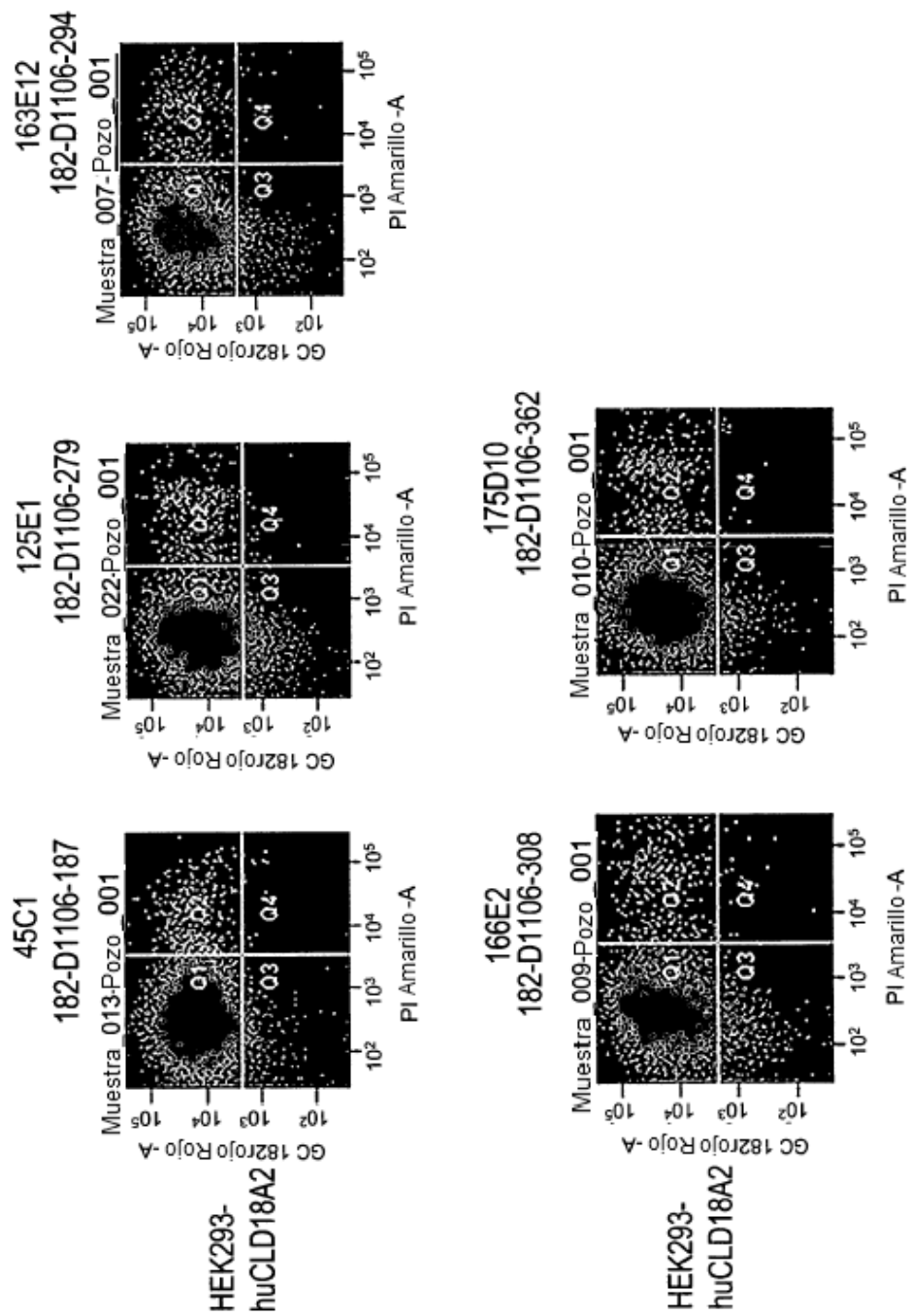


Fig. 5

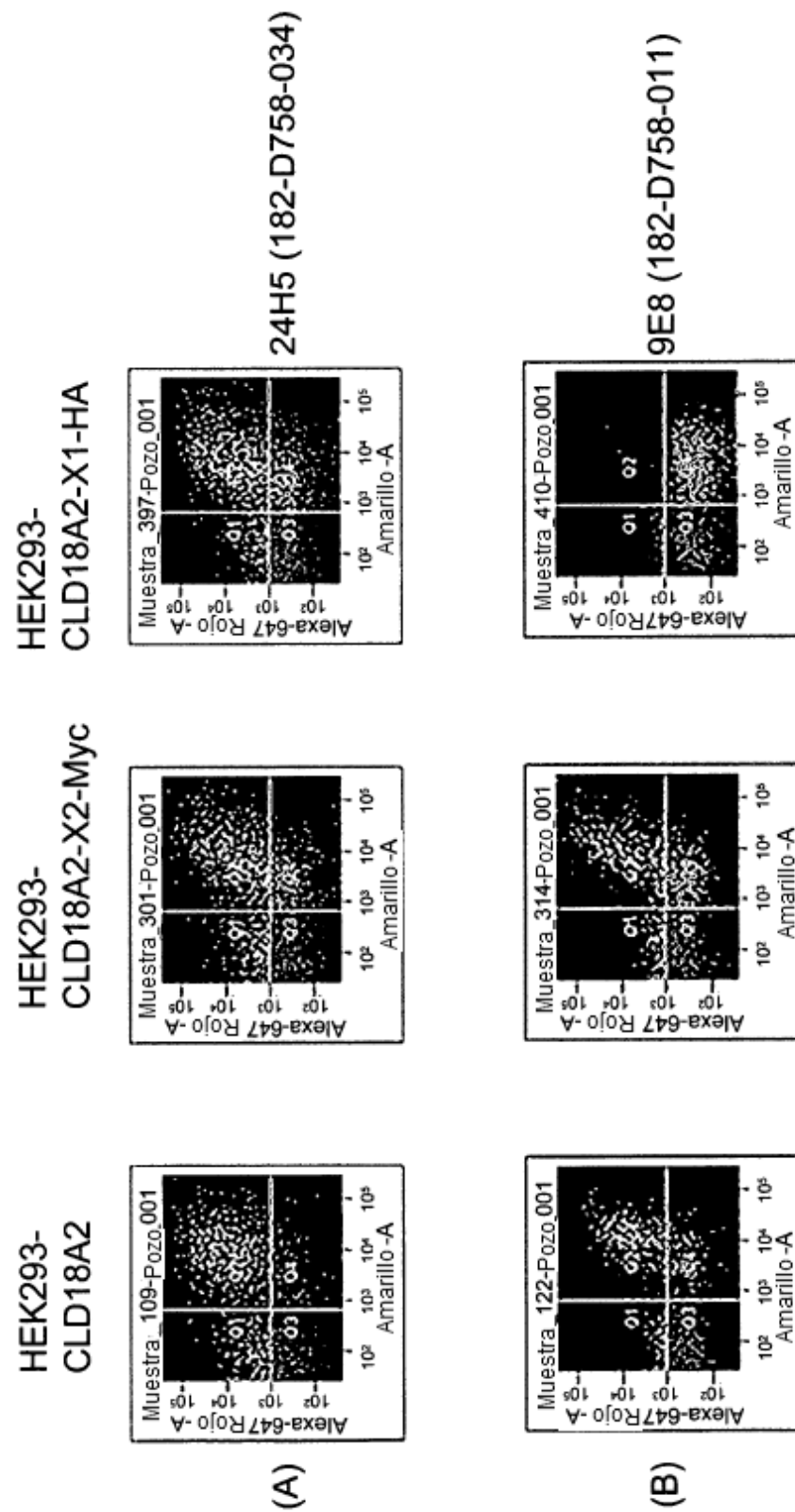


Fig. 5

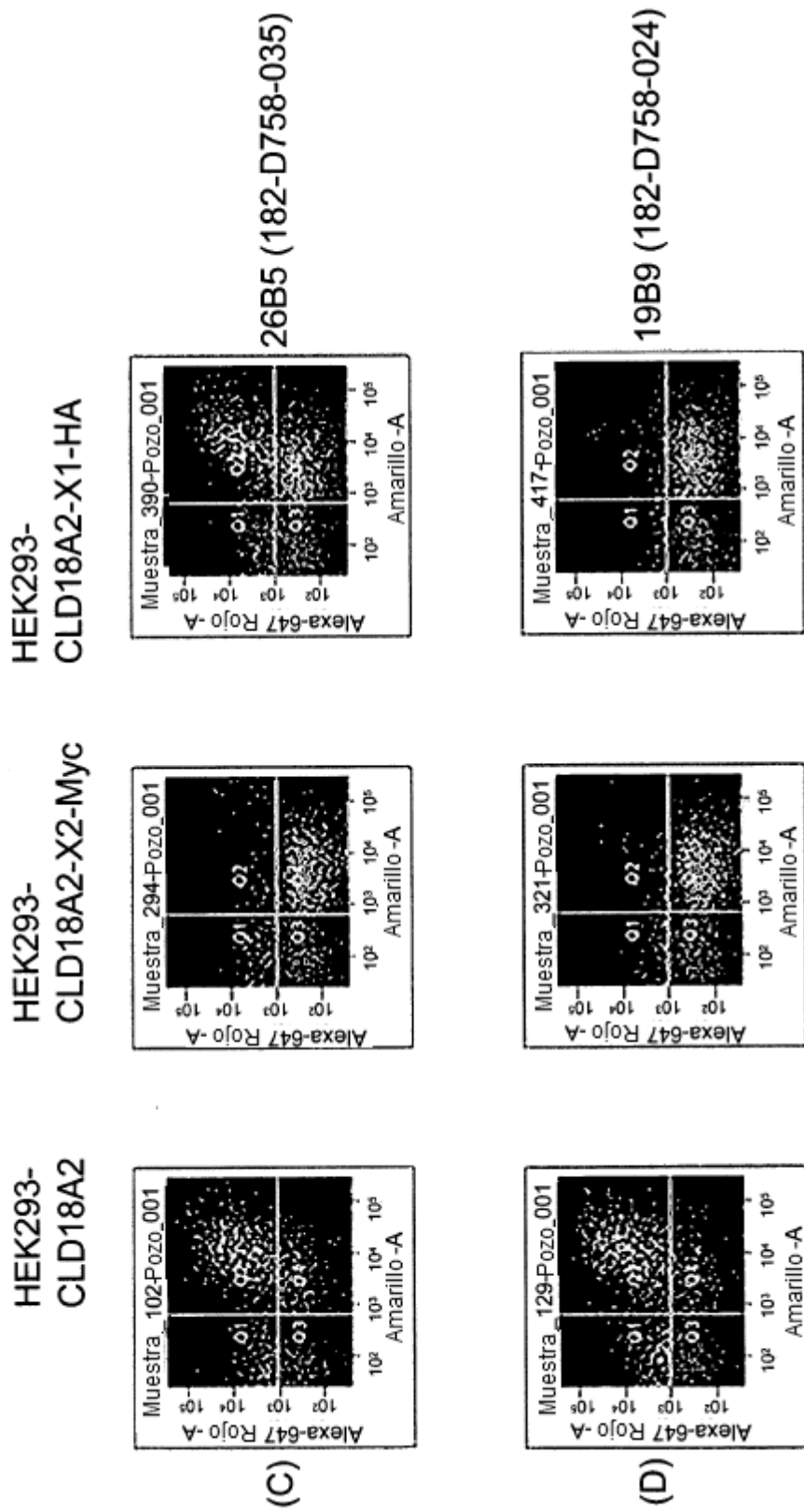


Fig. 6A

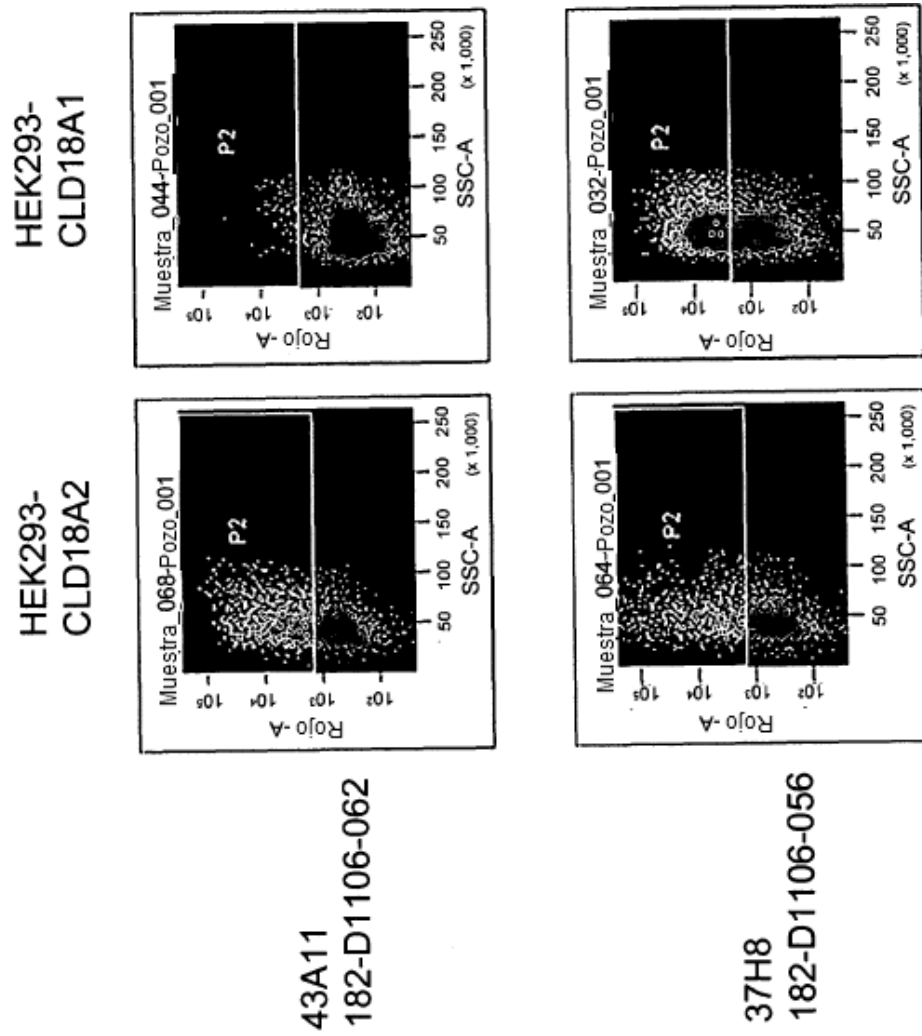
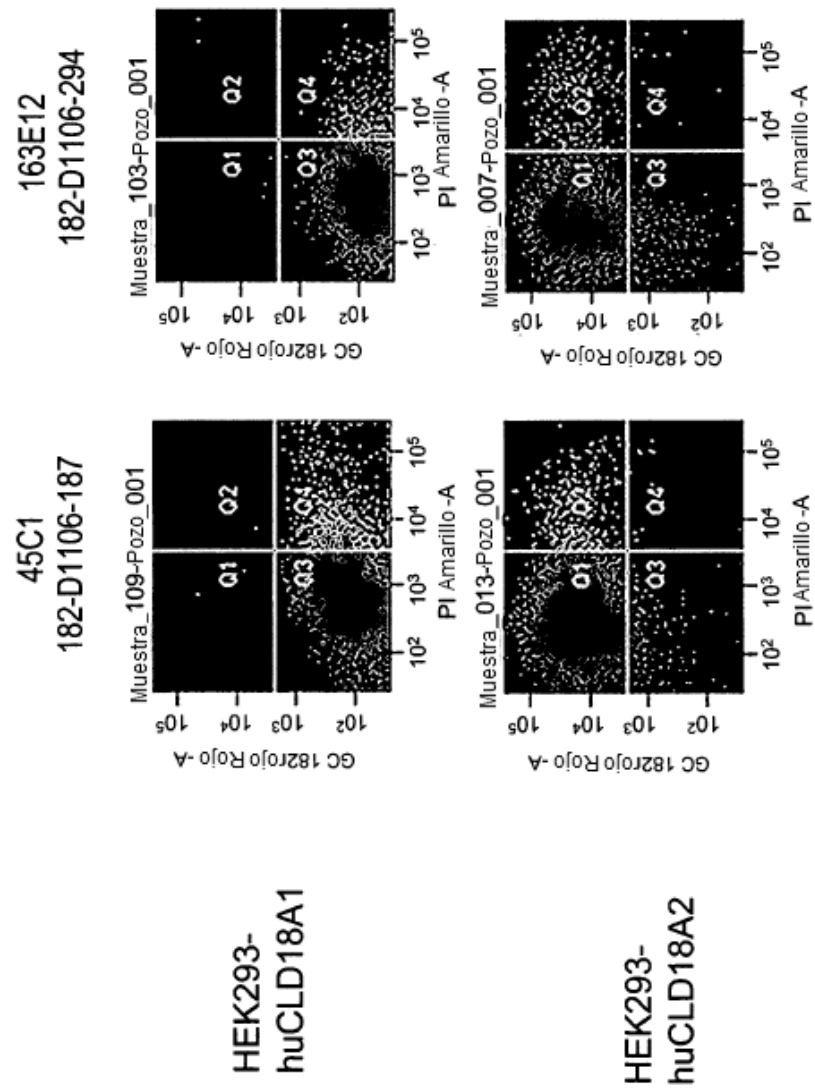


Fig. 6B



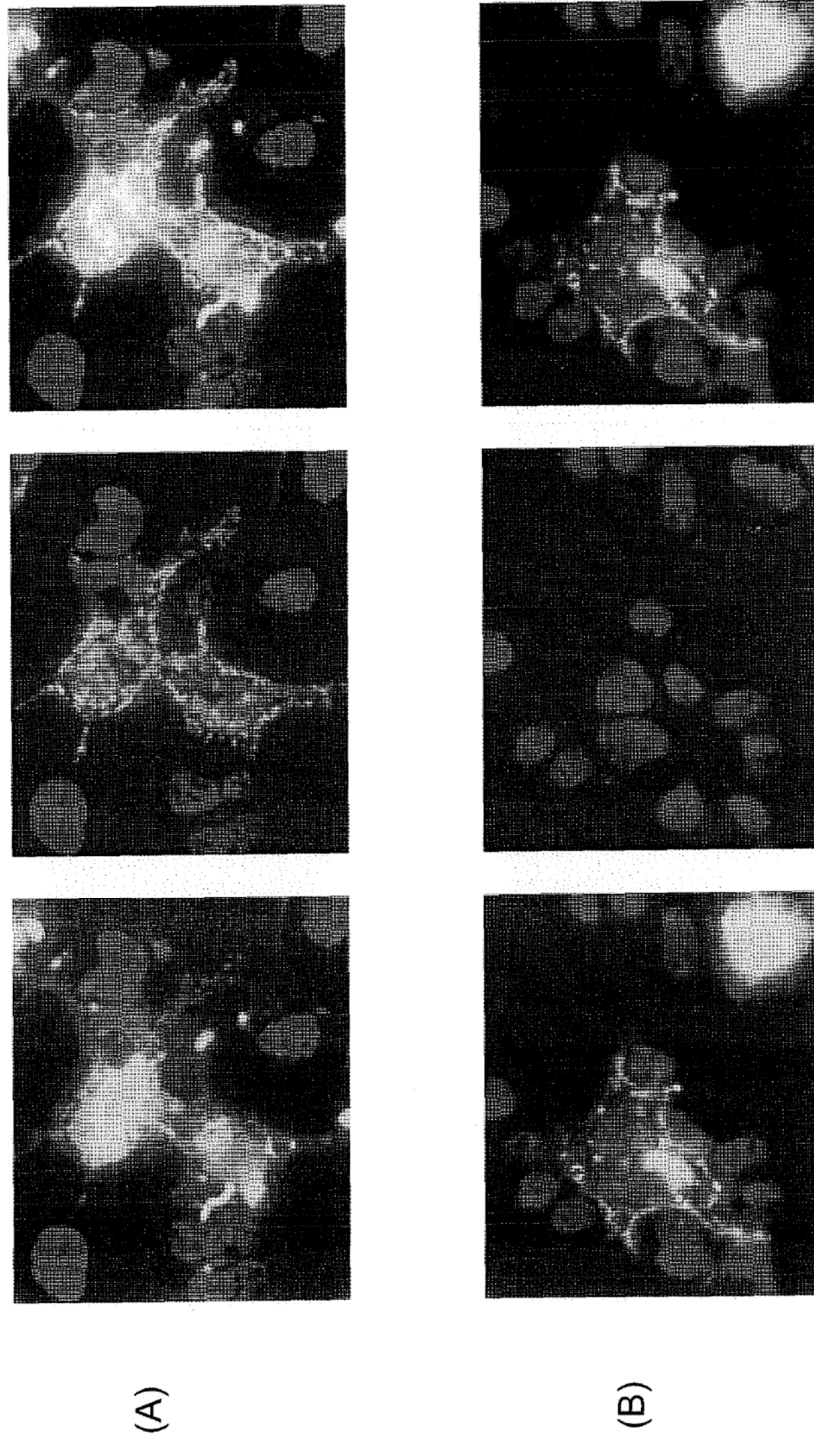
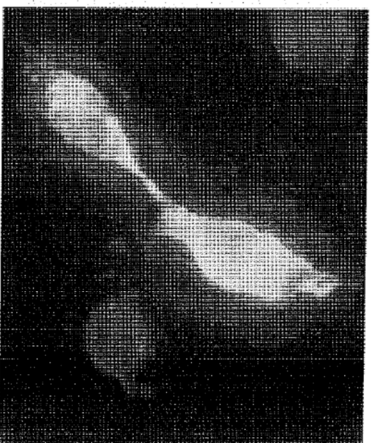
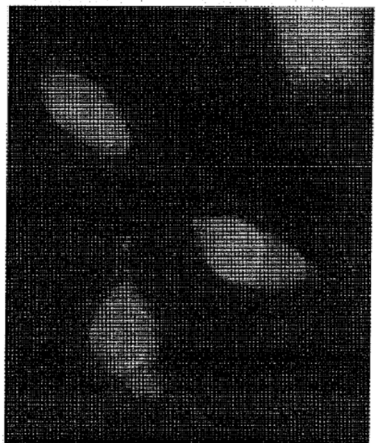
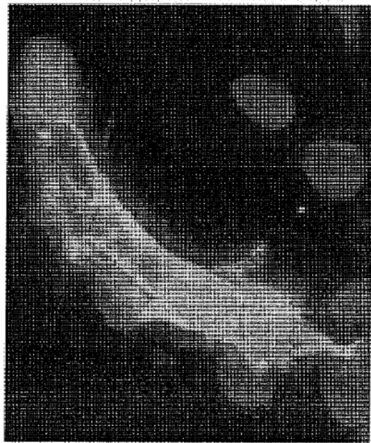
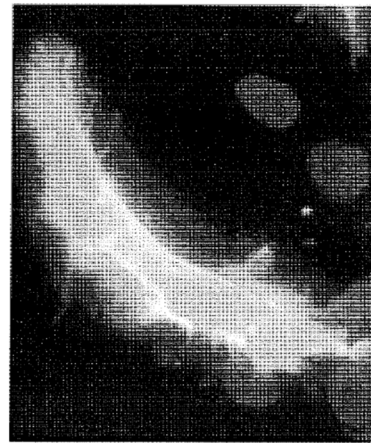


Fig. 7

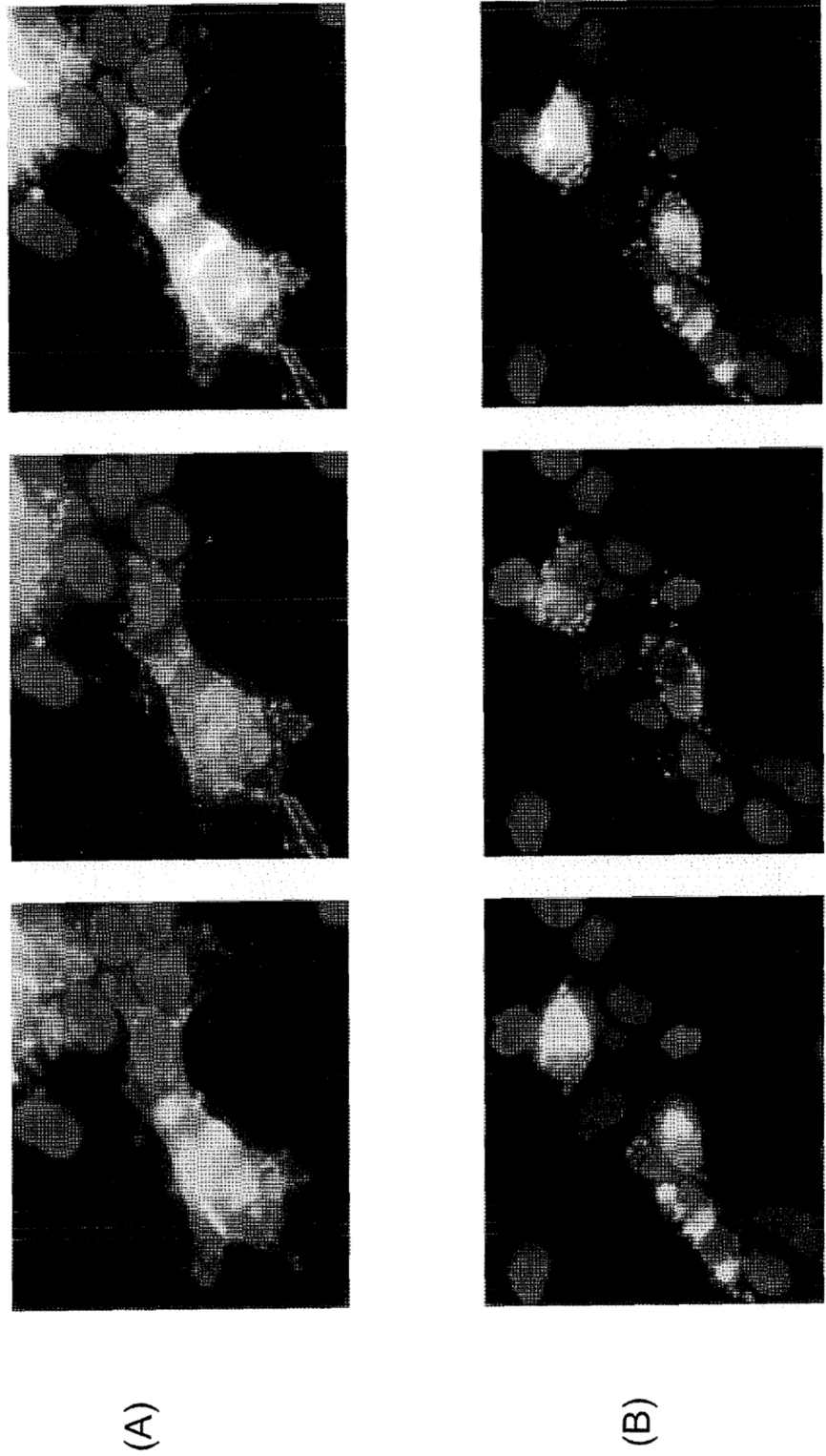


(C)

(D)

Fig. 7

Fig. 8



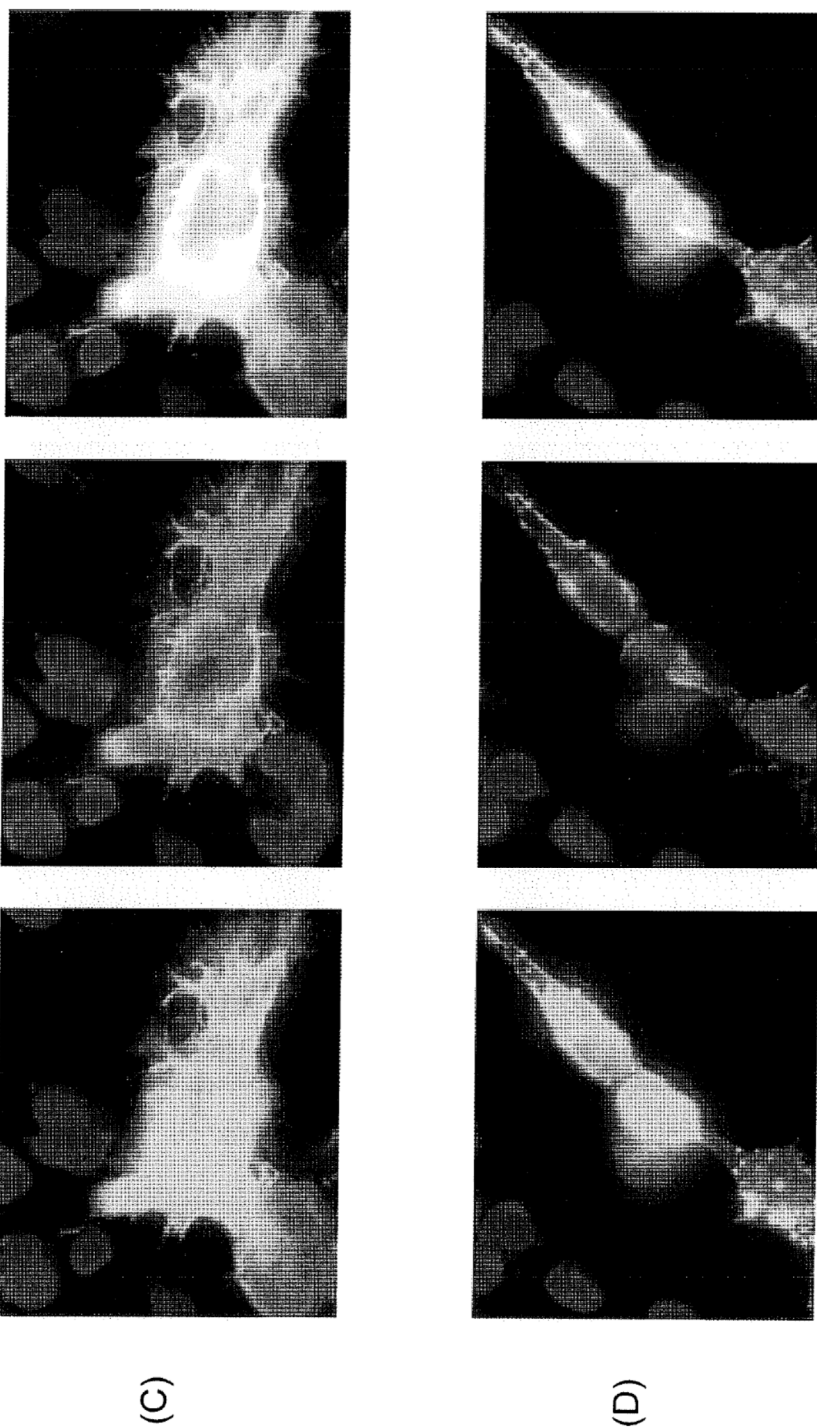
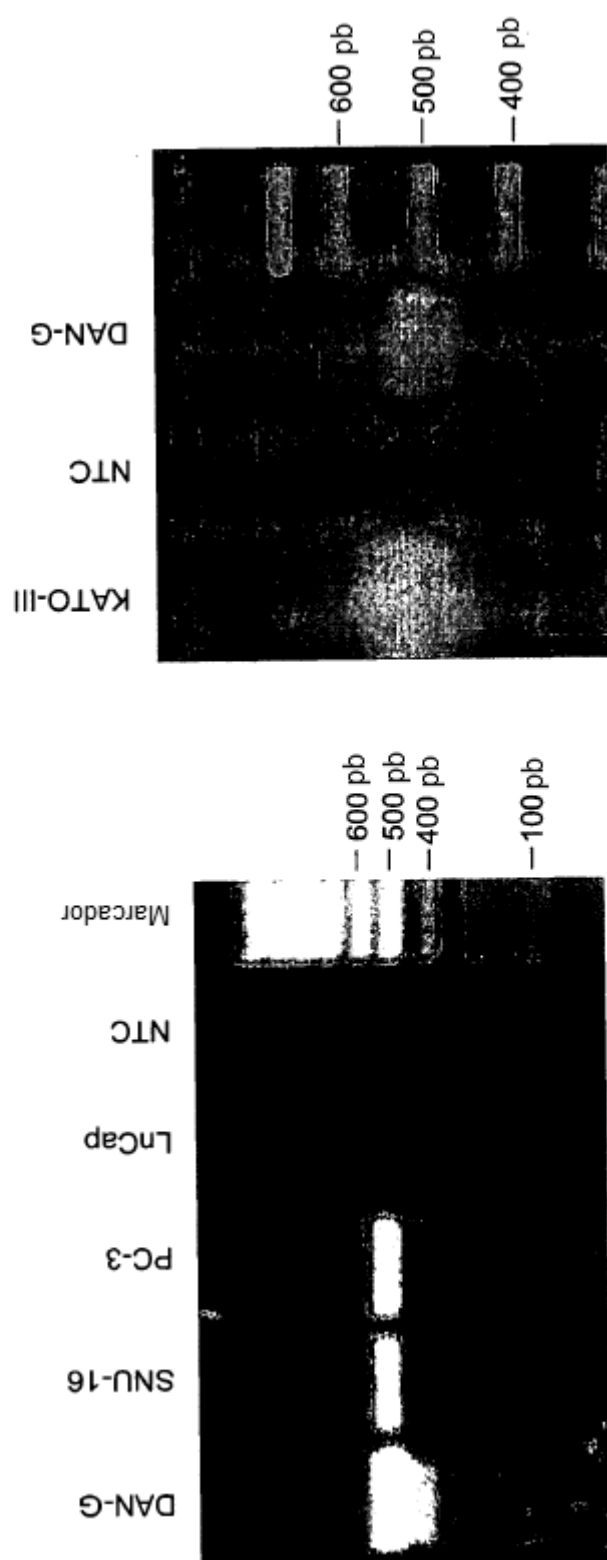


Fig. 8

Fig. 9



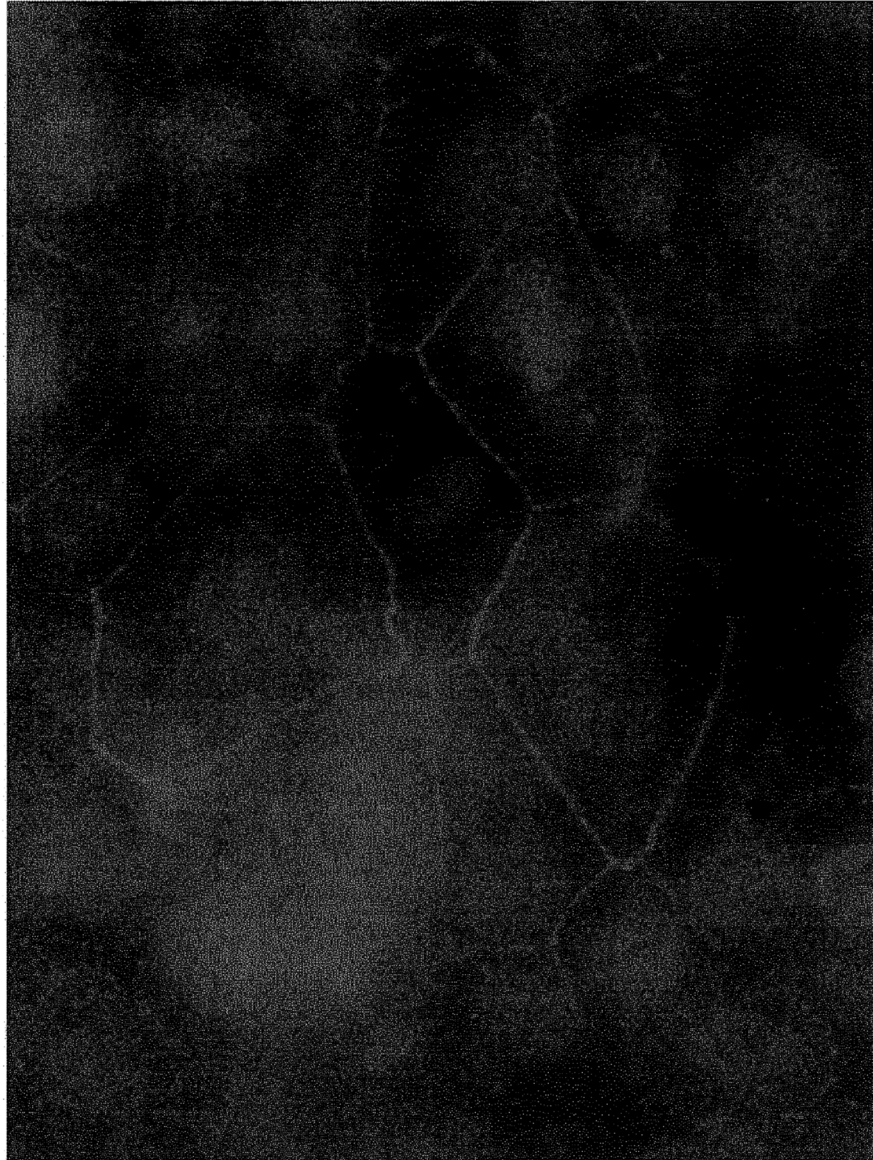


Fig. 10

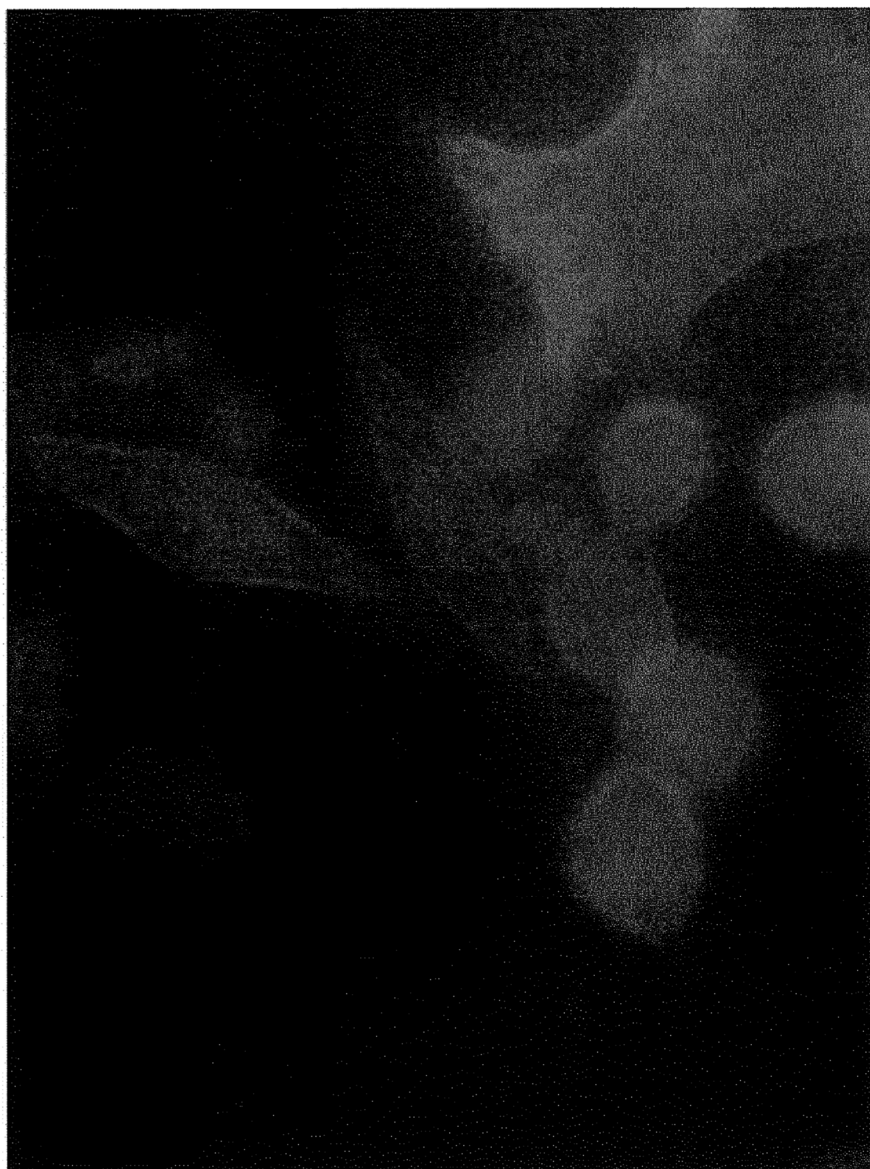


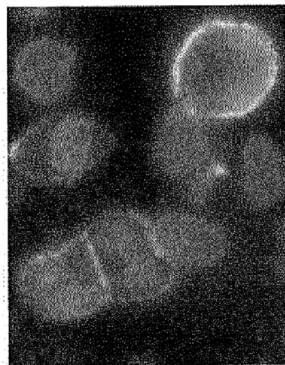
Fig. 11



Fig. 12A

Fig. 12B

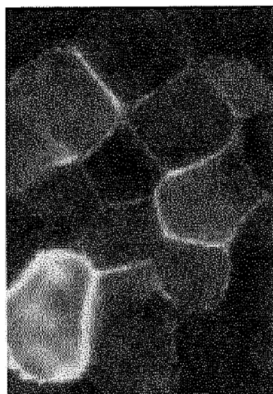
163E12
182-D1106-294



125E1
182-D1106-279

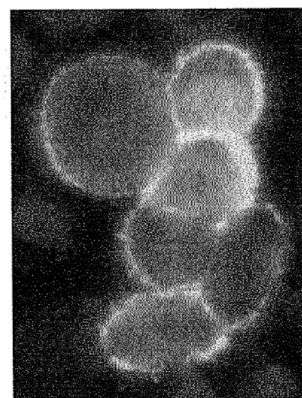


45C1
182-D758-187

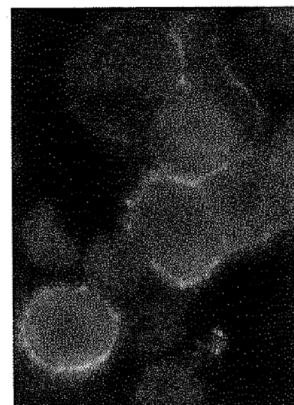


KATO-III

175D10
182-D1106-362



166E2
182-D1106-308



KATO-III

Fig. 13

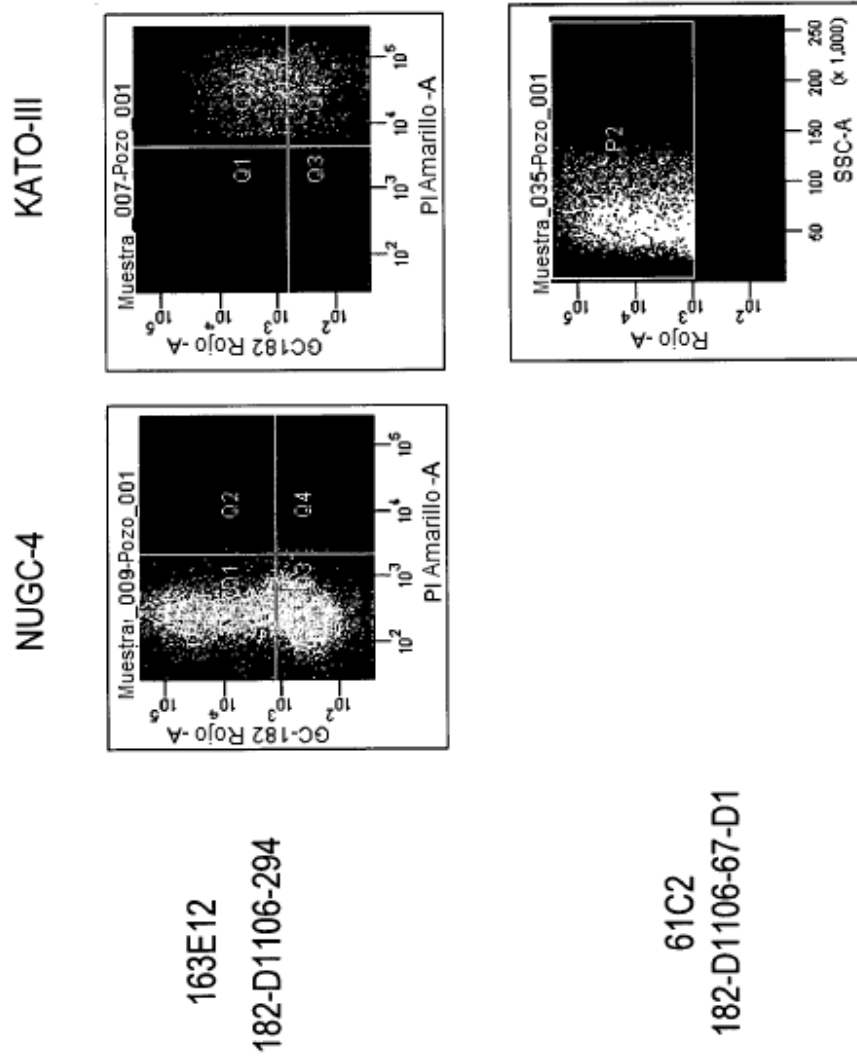


Fig. 14

NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	(1)	-----NATTCQVVGLLSILSLAGCIAATGMDMMSTQDLYDNPTAV	50
	(1)	-----MSITTCQVWAFLLSILGLAGCIAATGMDMMSTQDLYDNPTAV	
	(1)	-----MSVACQGLGFVWLSLIGFAGTAAATCMTQSTQDLYNNPTAV	
	(1)	-----MAVTACQGLGFVWLSLIGTAAATCMTQSTQDLYNNPTAV	
<hr/>			
Extracellular			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	51	FQVEGLWRSVQSSQFTCECRPYFTLLGLPMLQAVRALMIVGVLG	100
	(44)	FQVEGLWRSVQSSQFTCECRPYFTLLGLPMLQAVRALMIVGVLG	
	(44)	FQVEGLWRSVQSSQFTCECRPYFTLLGLPMLQAVRALMIVGVLG	
	(44)	FQVEGLWRSVQSSQFTCECRPYFTLLGLPMLQAVRALMIVGVLG	
<hr/>			
Extracellular 1			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	101	ELVSIFALKCIRIGSMDSAKAKMTLTSGLFTISGICAIIGSVFANML	150
	(94)	ELVSIFALKCIRIGSMDSAKAKMTLTSGLFTISGICAIIGSVFANML	
	(94)	ELVSIFALKCIRIGSMDSAKAKMTLTSGLFTISGICAIIGSVFANML	
	(94)	ELVSIFALKCIRIGSMDSAKAKMTLTSGLFTISGICAIIGSVFANML	
<hr/>			
Extra / intra 3 N-Glyc			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	151	VTNFMSTANMYSGMGGMGNVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLGGV	200
	(144)	VTNFMSTANMYSGMGGMGNVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLGGV	
	(144)	VTNFMSTANMYSGMGGMGNVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLGGV	
	(144)	VTNFMSTANMYSGMGGMGNVQTVQTRYTFGAALFVGWVAGGLTLGGV	
<hr/>			
Extracellular 2			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	201	MNCIACRGLTPDSSNFKAVSHASQNVAYPPGGFKASTGFGSNTFNKKI	250
	(194)	MNCIACRGLTPDSSNFKAVSHASQNVAYPPGGFKASTGFGSNTFNKKI	
	(191)	MNCIACRGLTPDSSNFKAVSHASQNVAYPPGGFKASTGFGSNTFNKKI	
	(194)	MNCIACRGLTPDSSNFKAVSHASQNVAYPPGGFKASTGFGSNTFNKKI	
<hr/>			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	251	YDGGARTEDDEQSHPTVYDV	271
	(244)	YDGGARTEDDEQSHPTVYDV	
	(241)	YDGGARTEDDEQSHPTVYDV	
	(244)	YDGGARTEDDEQSHPTVYDV	
<hr/>			
NP_062789 NP_057453 AAL15636 NP_001002026	(241)	YDGGARTEDDEQSHPTVYDV	

Fig. 15A

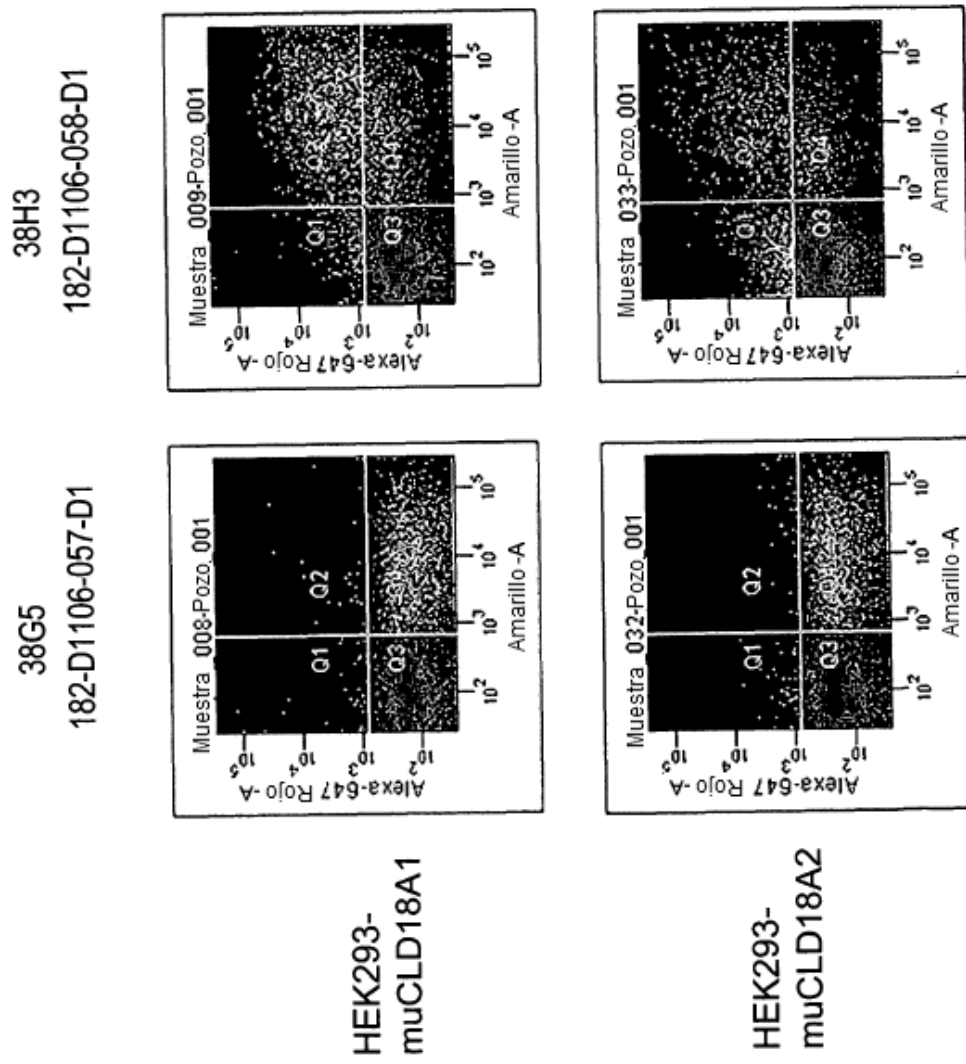


Fig. 15B

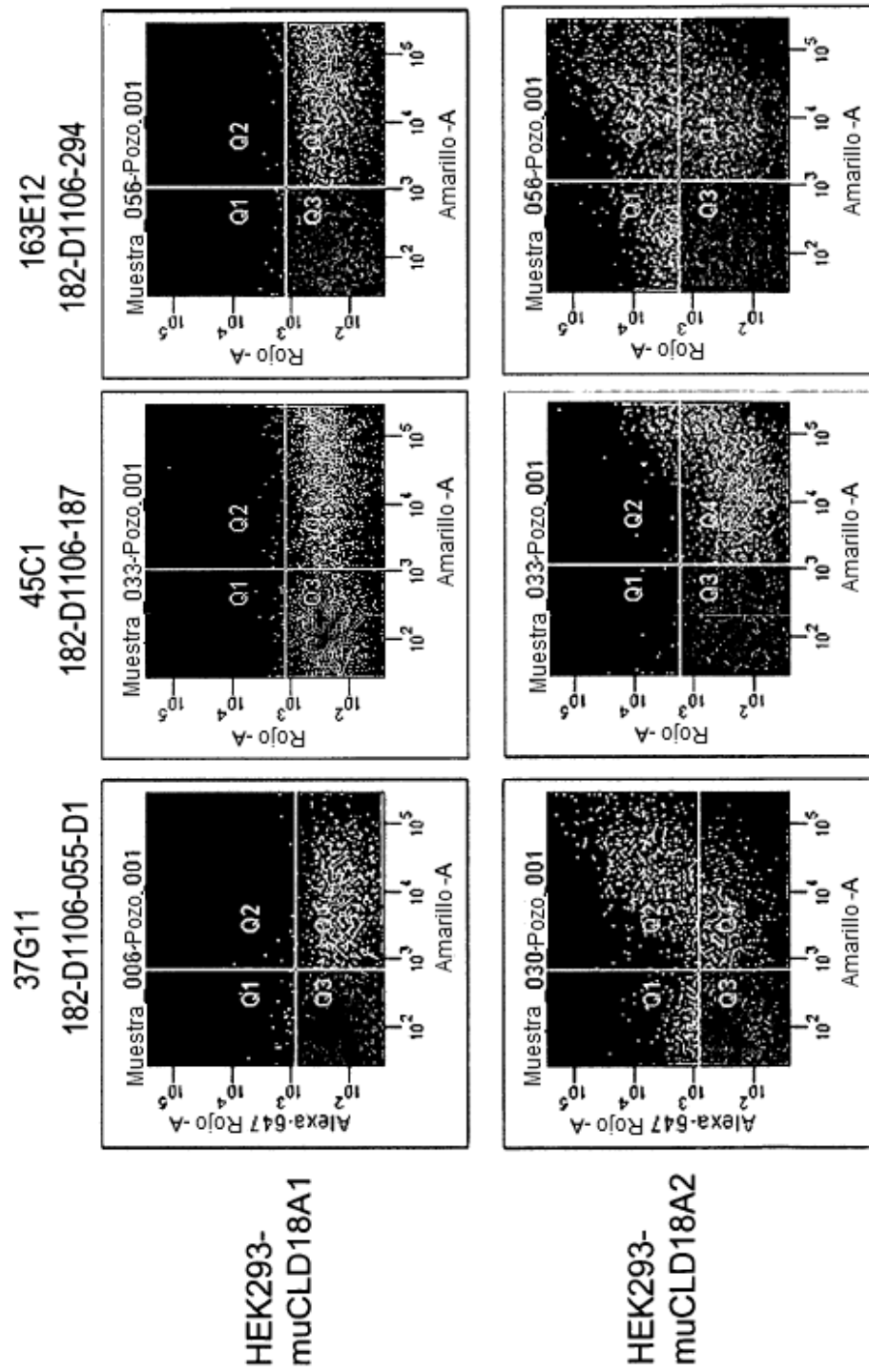
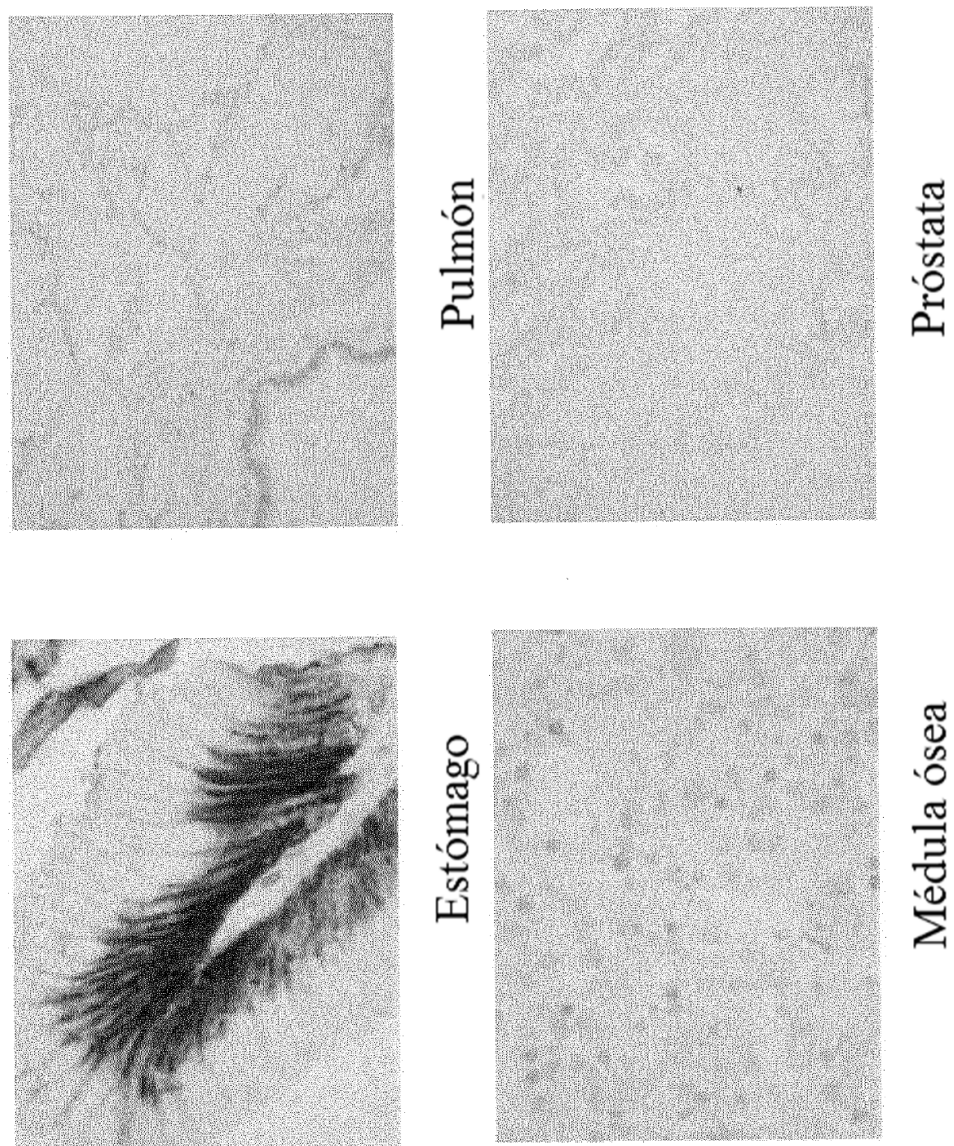


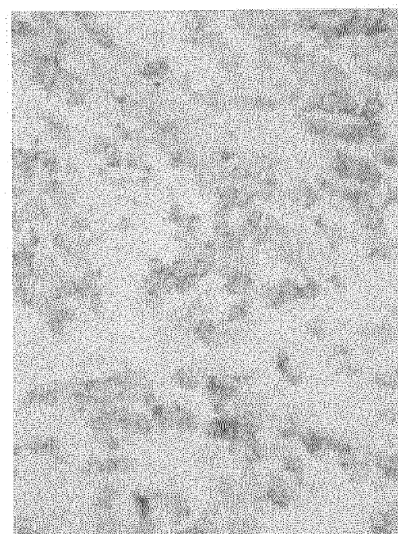
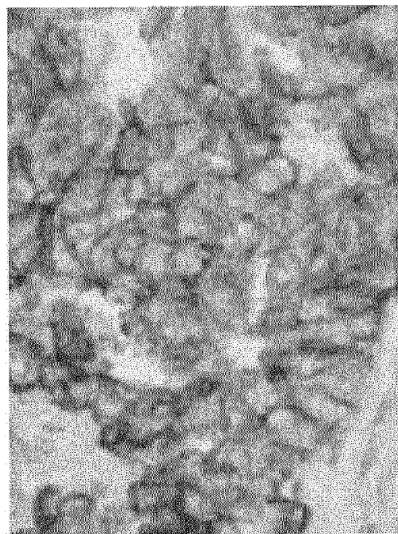
Fig. 16



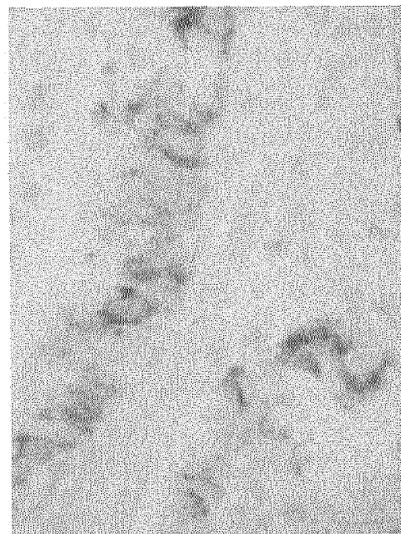
(A)

Fig. 16

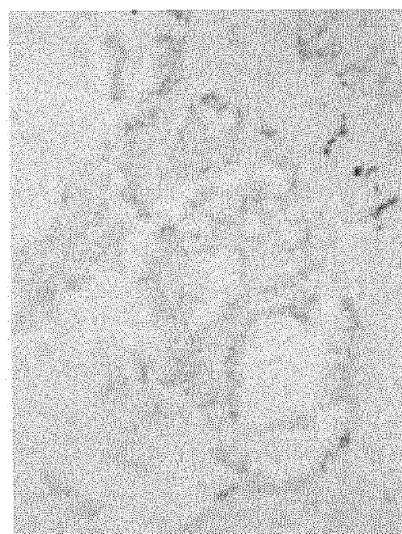
Carcinomas de estómago

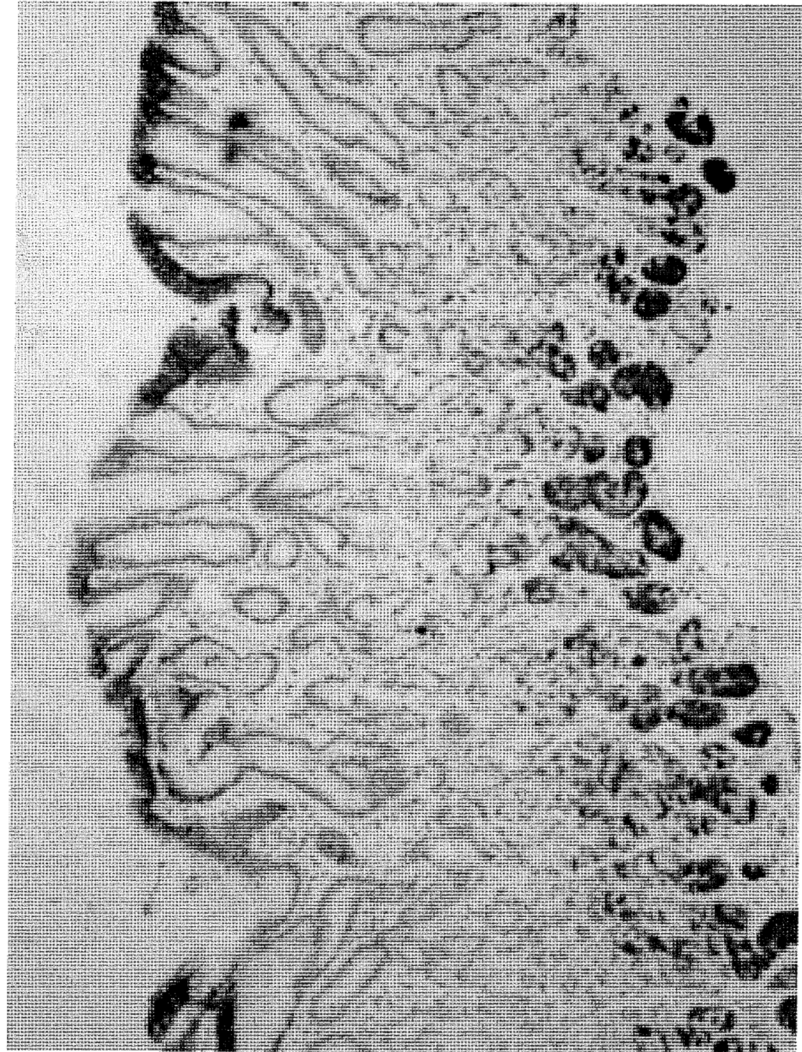


(B)



Carcinomas de pulmón





(c)

Fig. 16

Fig. 17

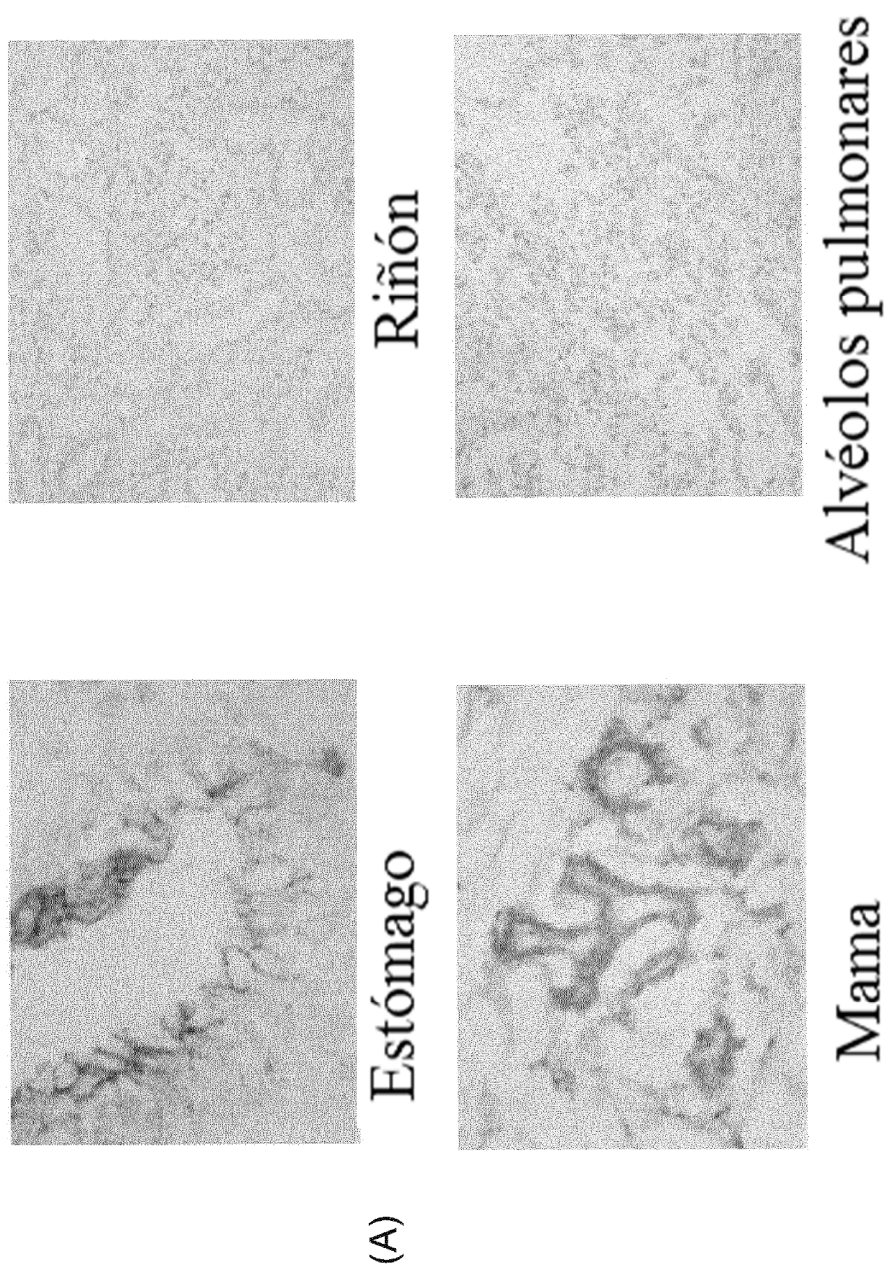
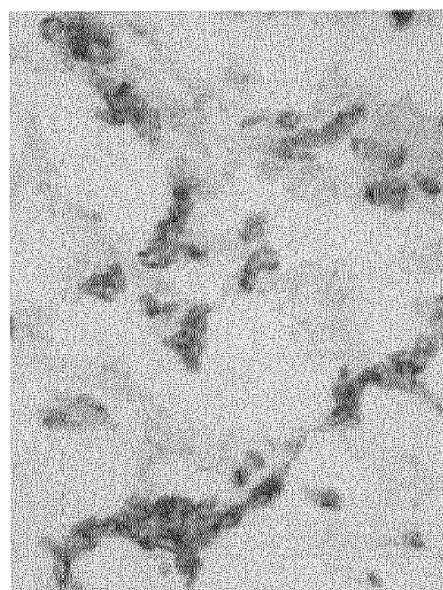
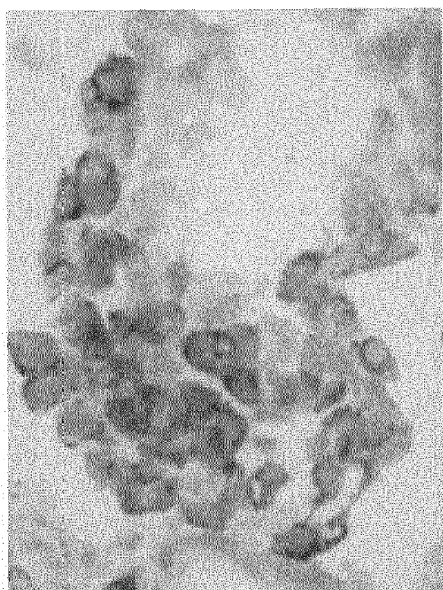
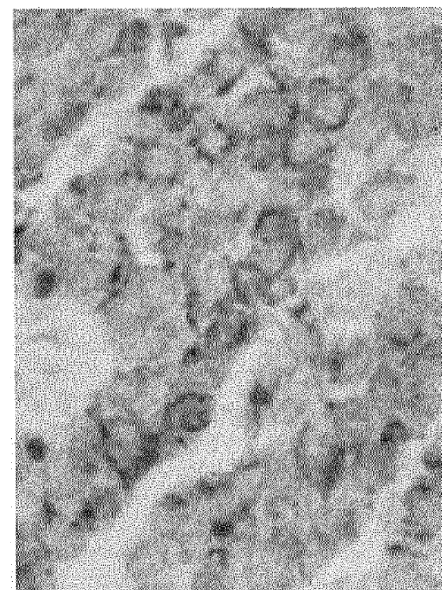
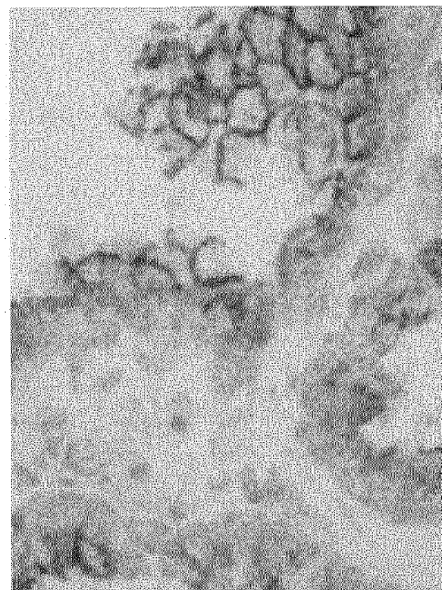


Fig. 17

Carcinomas de estómago



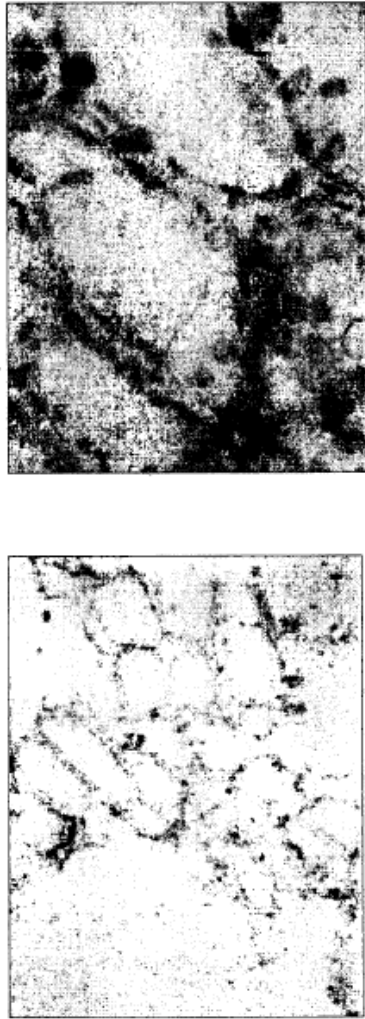
(B)



Carcinomas de pulmón

Fig. 18A

Estómago normal



Carcinomas de estómago



Fig. 18B

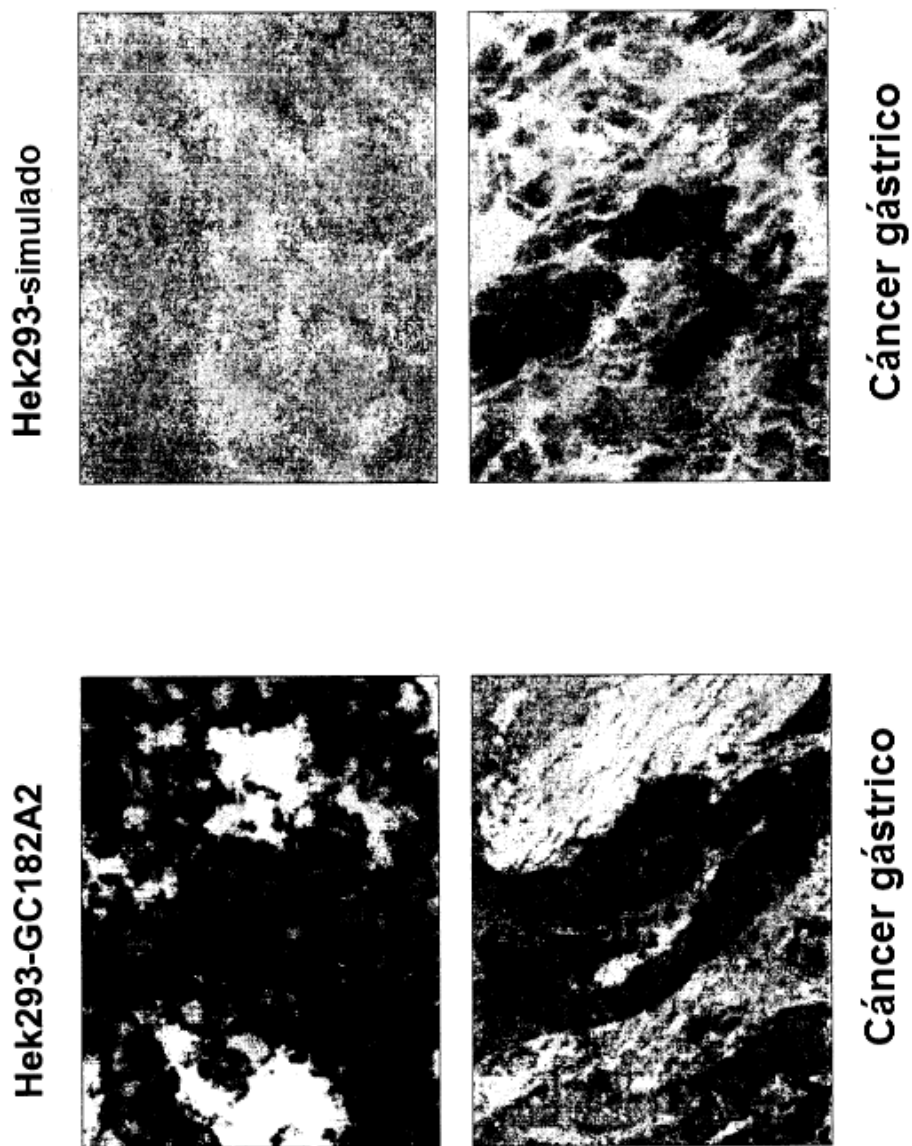


Fig. 18C

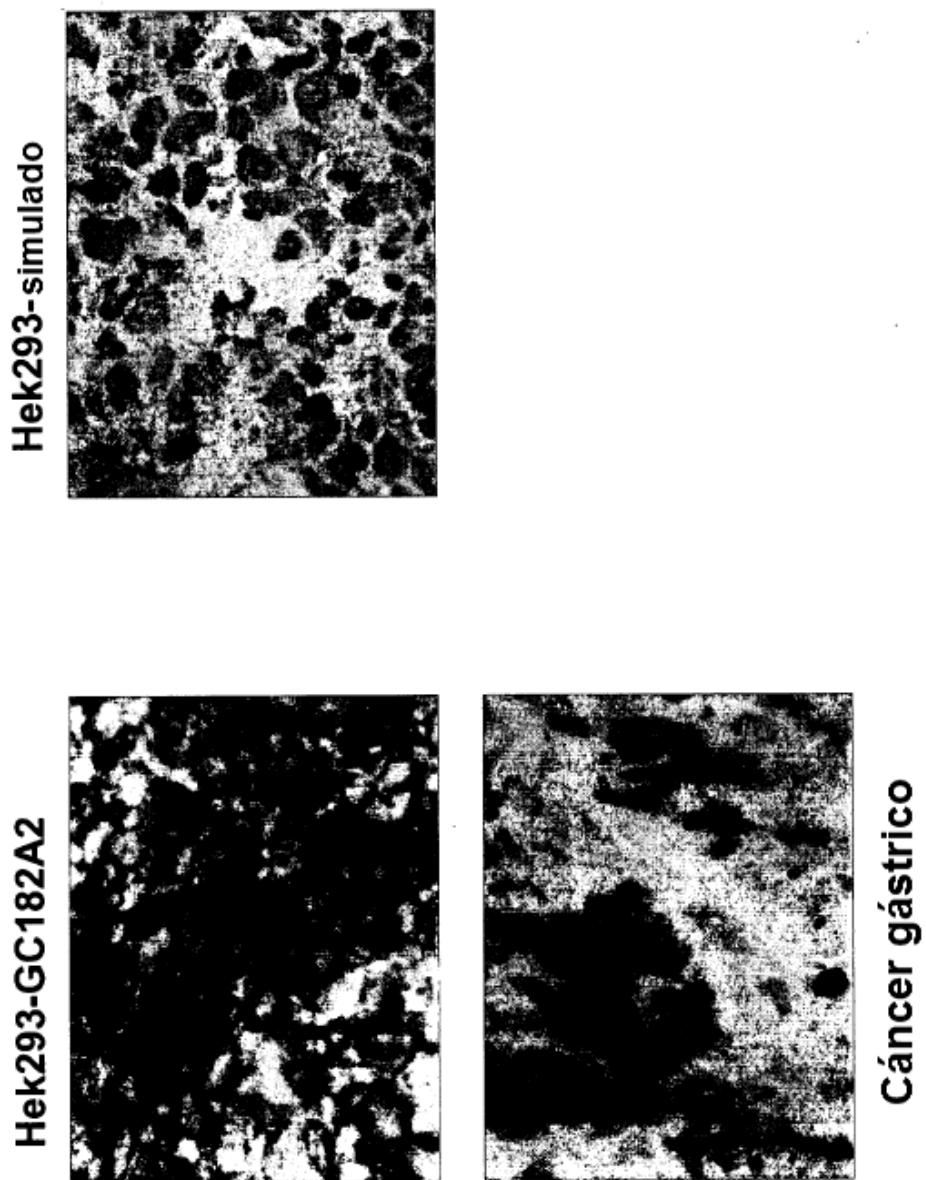
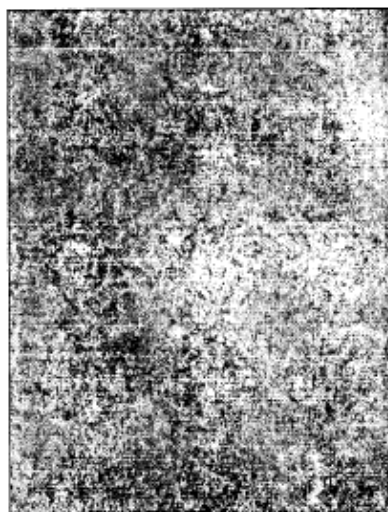


Fig. 18D

Hek293-GC182A2



Hek293-simulado



Cáncer gástrico

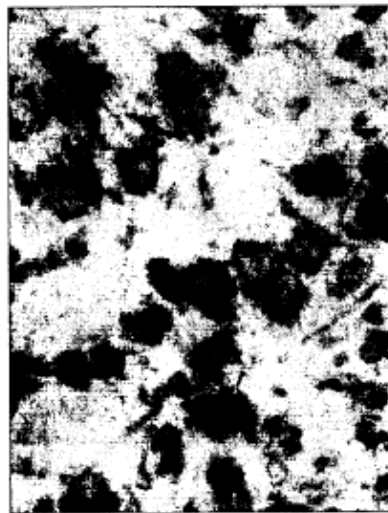
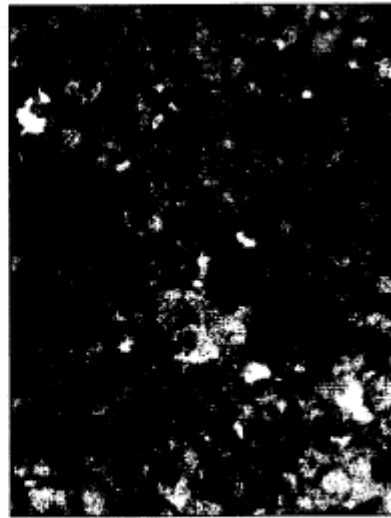


Fig. 18E

Hek293-GC182A2



Hek293-simulado

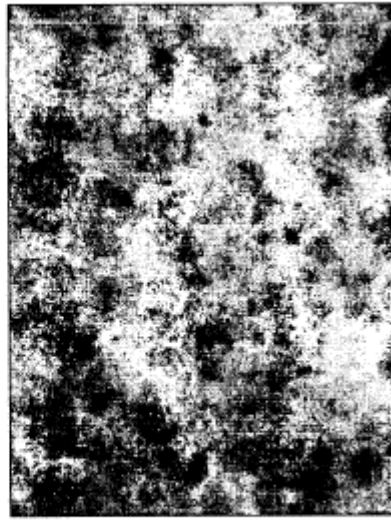


Fig. 19

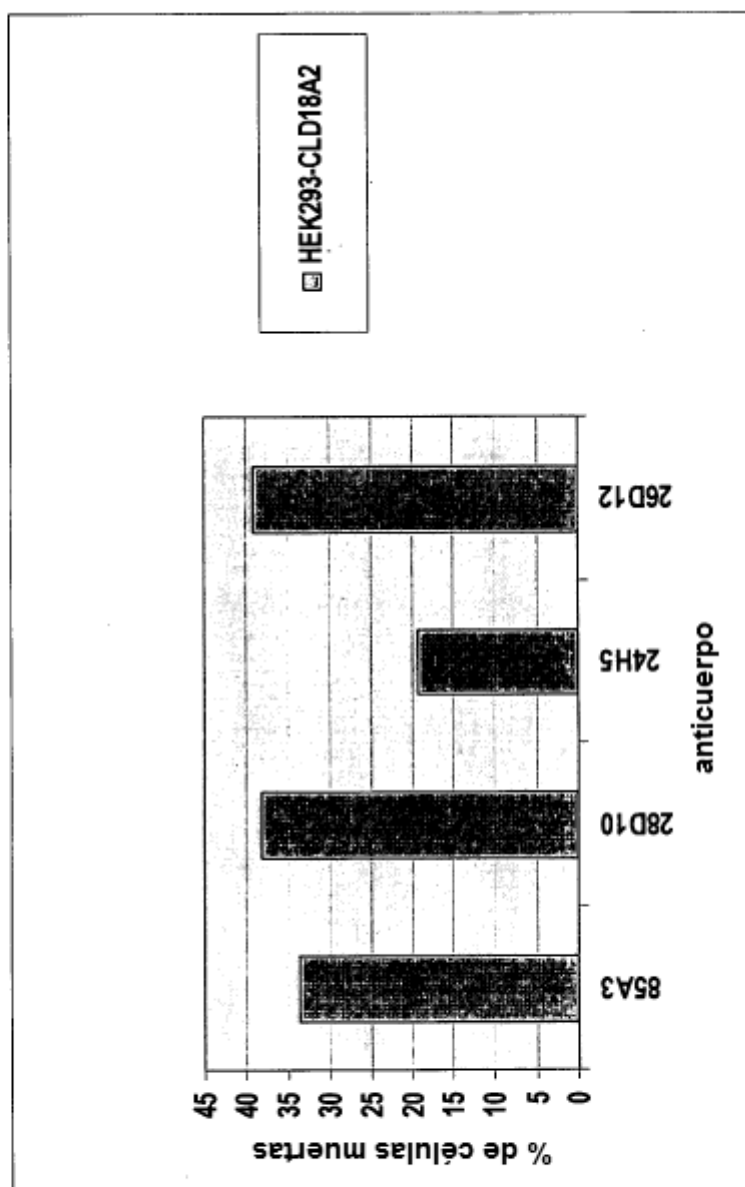


Fig. 20

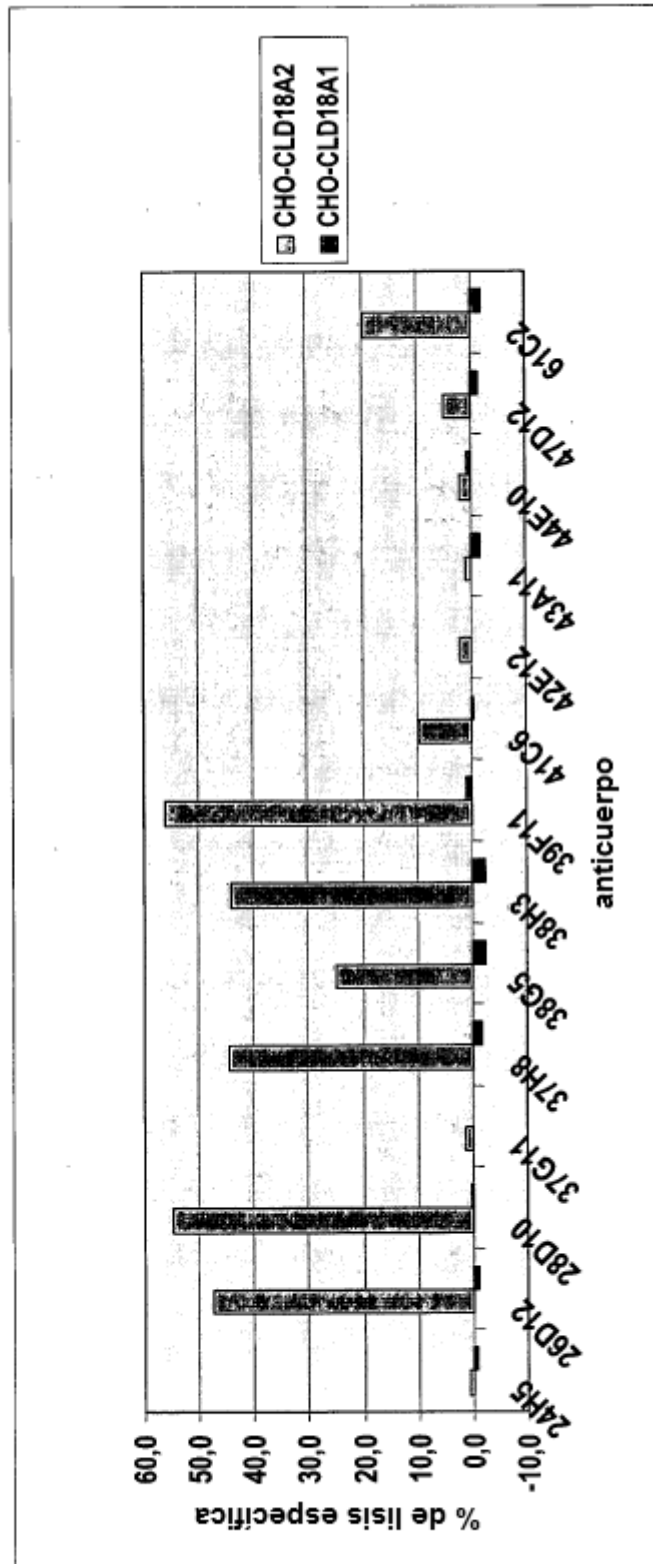


Fig. 21

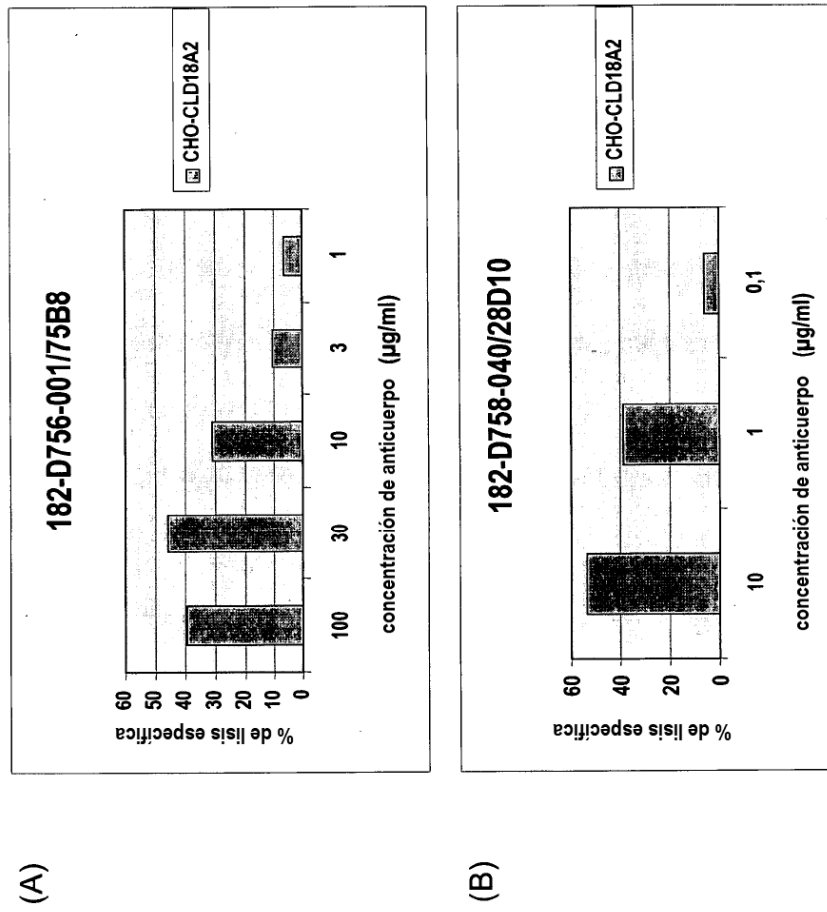


Fig. 21

(C)

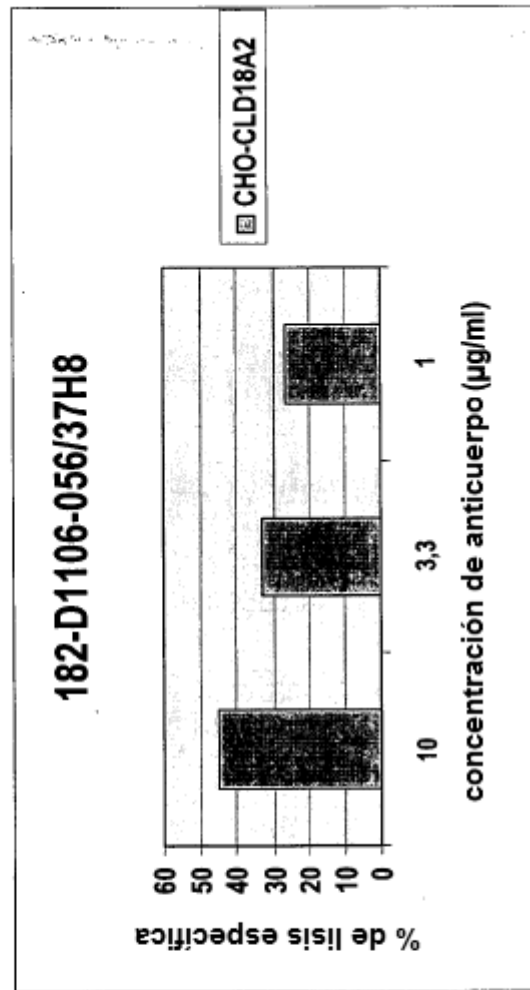


Fig. 22

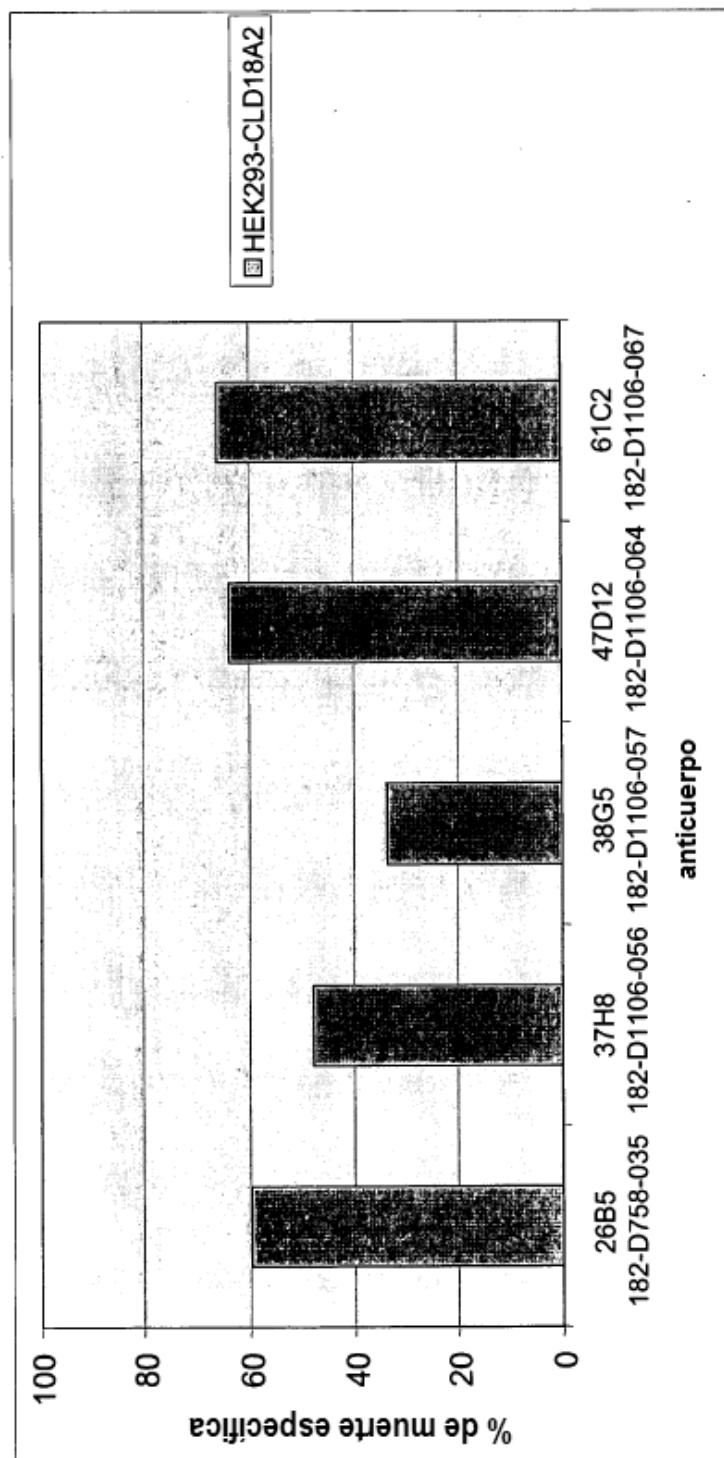


Fig. 23

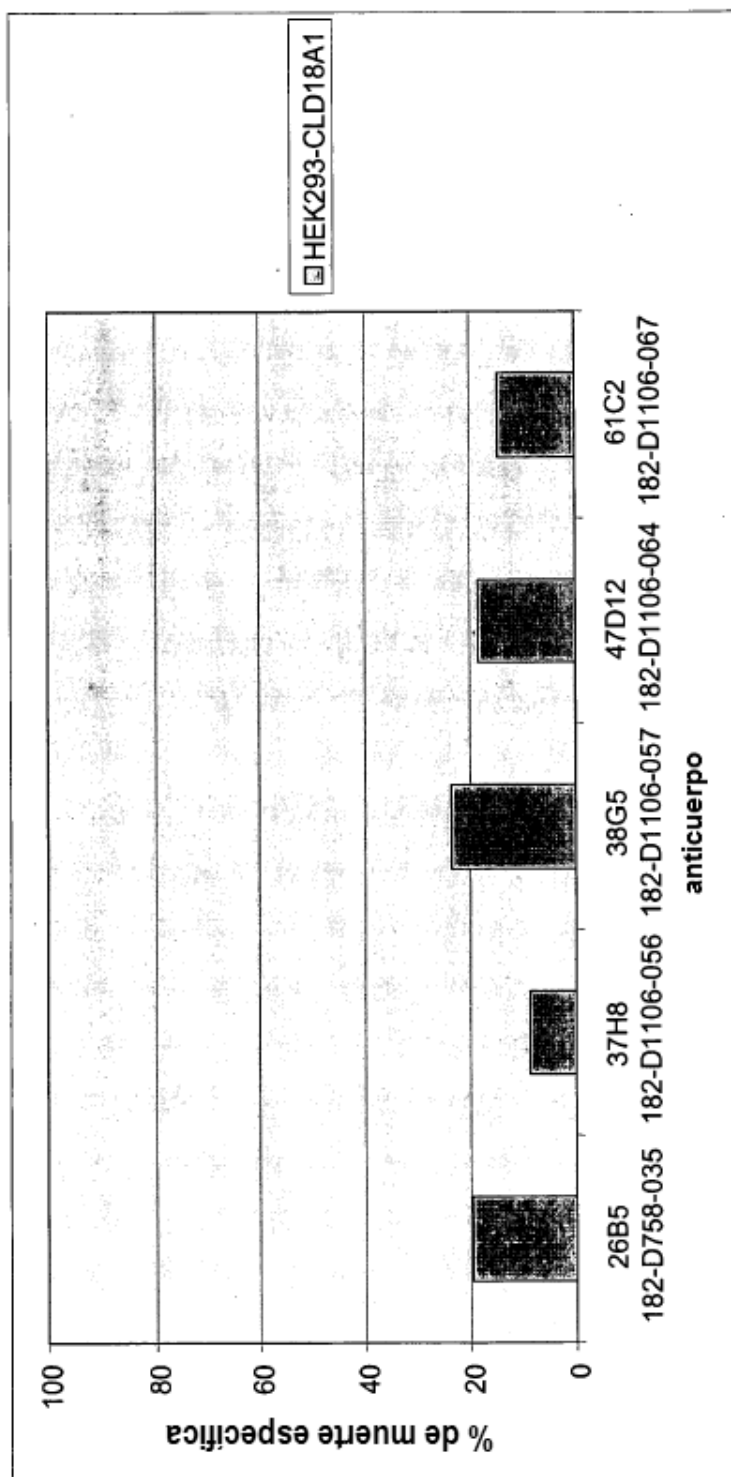


Fig. 24

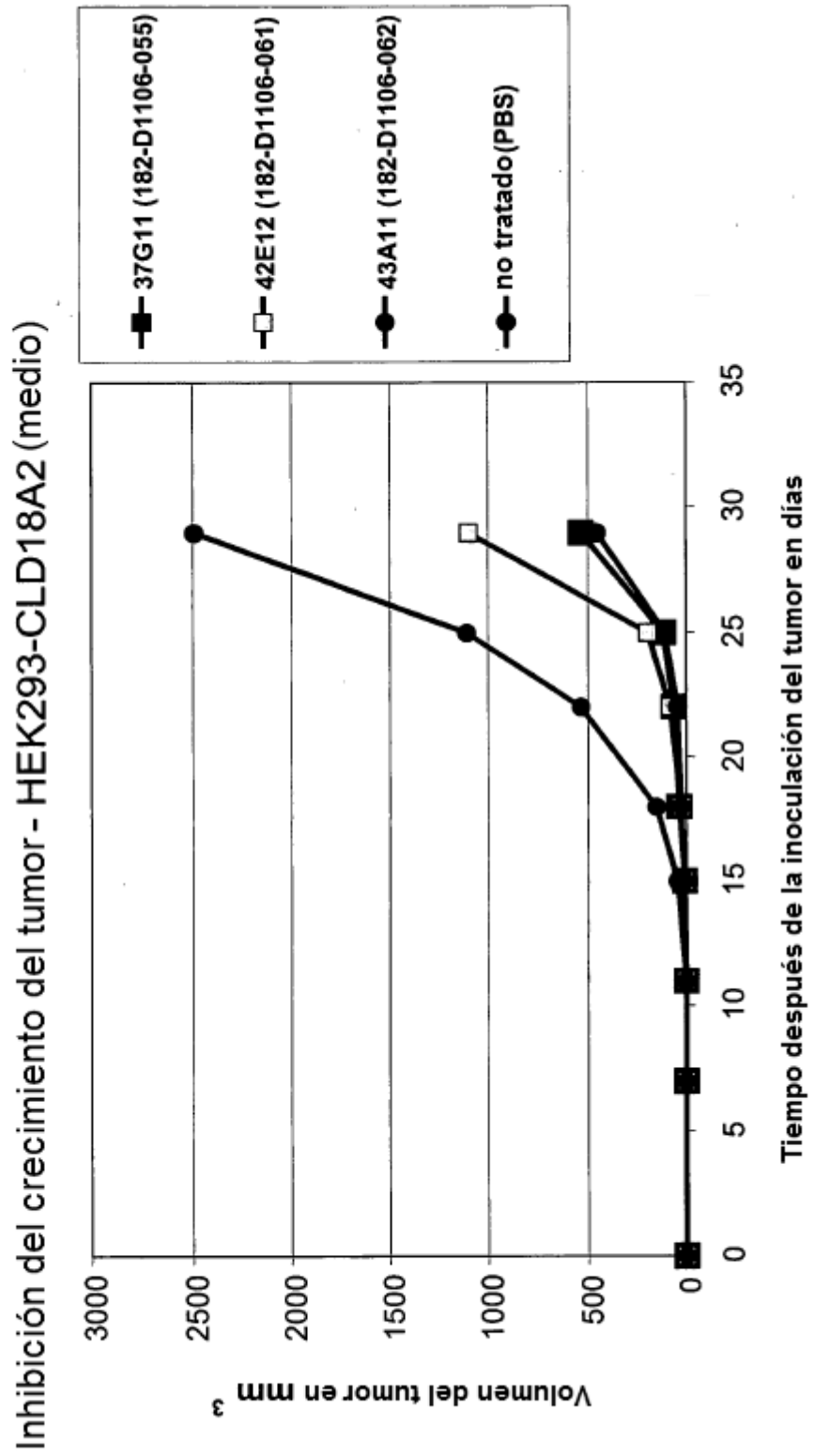


Fig. 25A

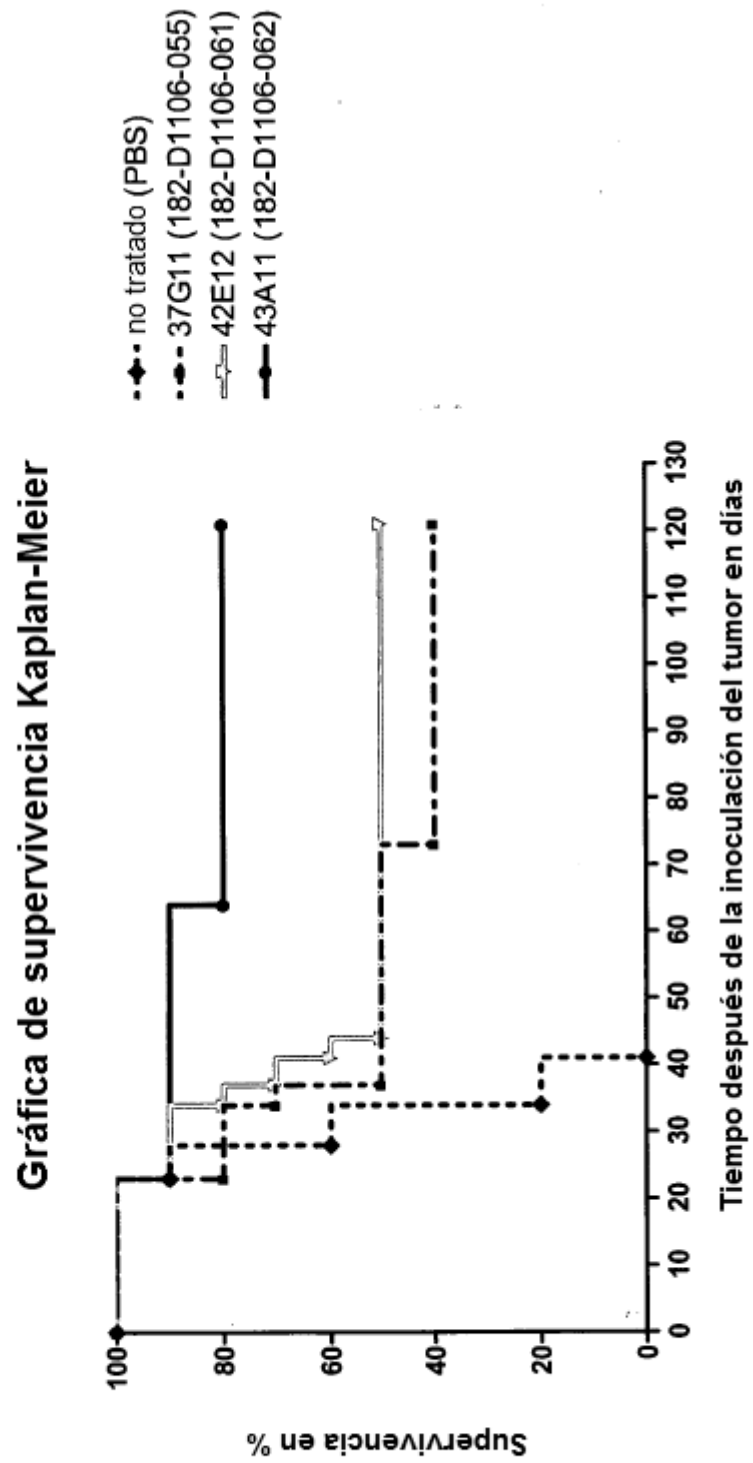


Fig. 25B

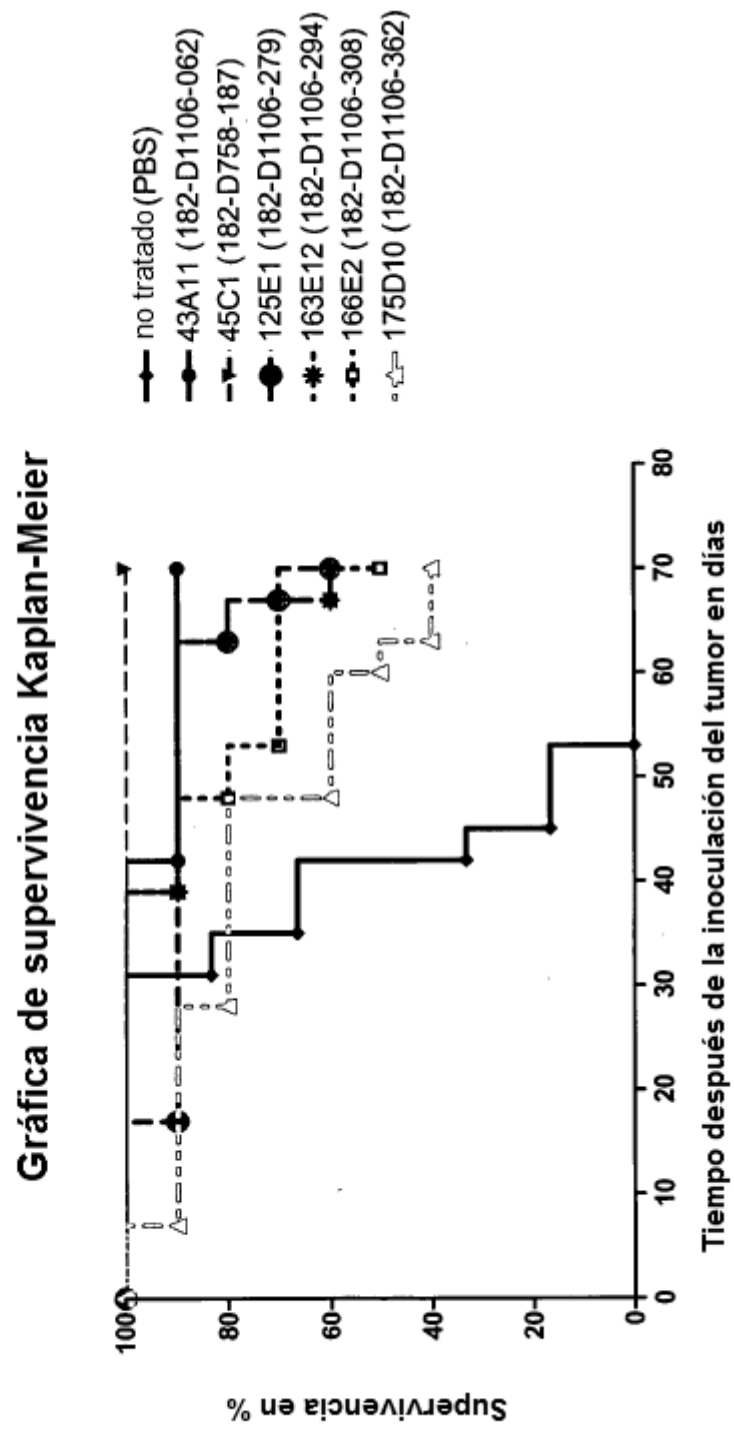


Fig. 26

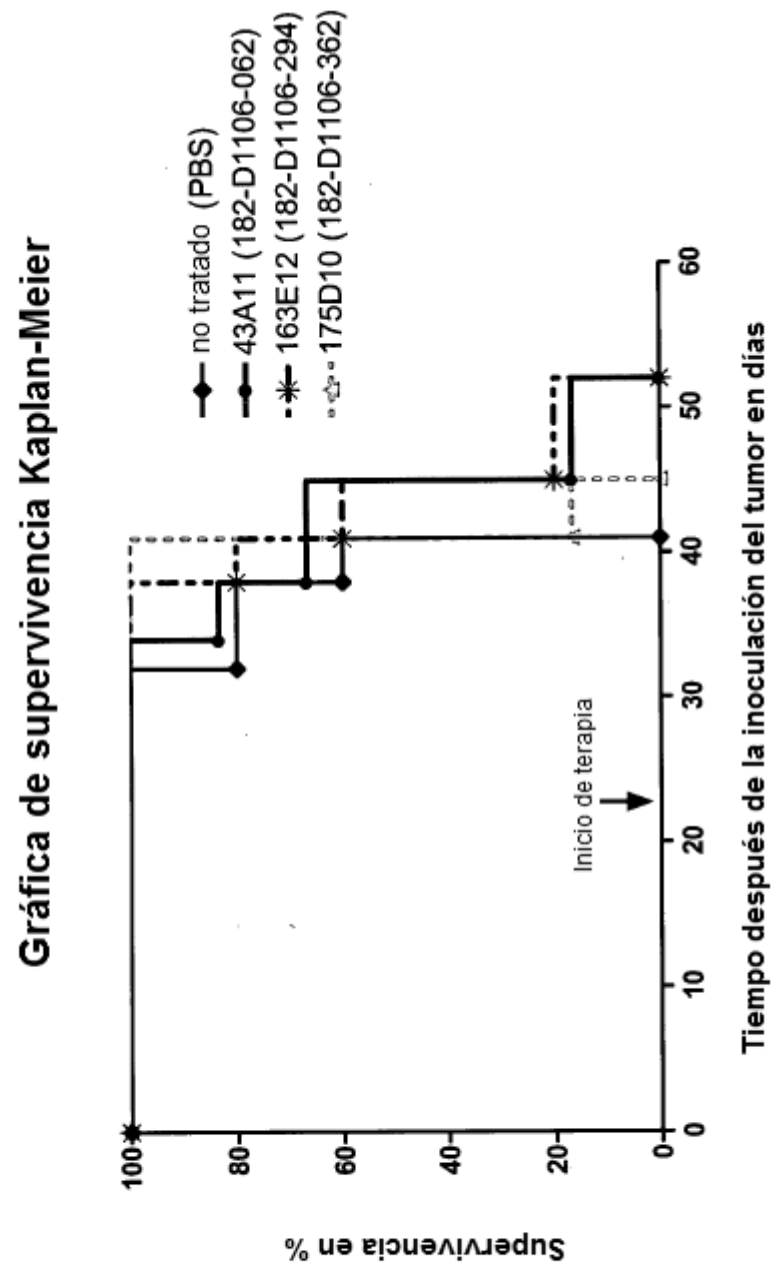


Fig. 27A

Inhibición del crecimiento del tumor - DAN-G (medio)

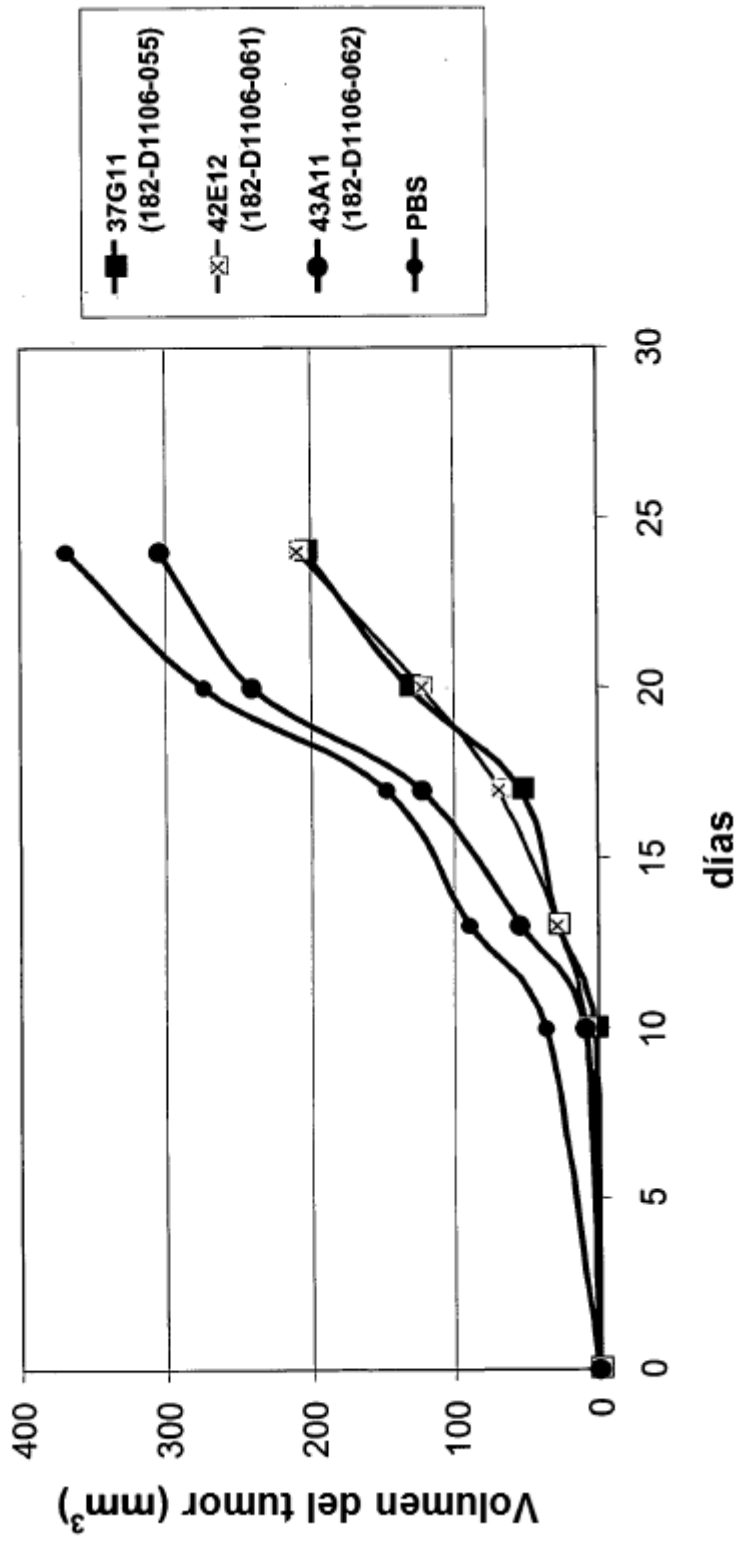


Fig. 27B

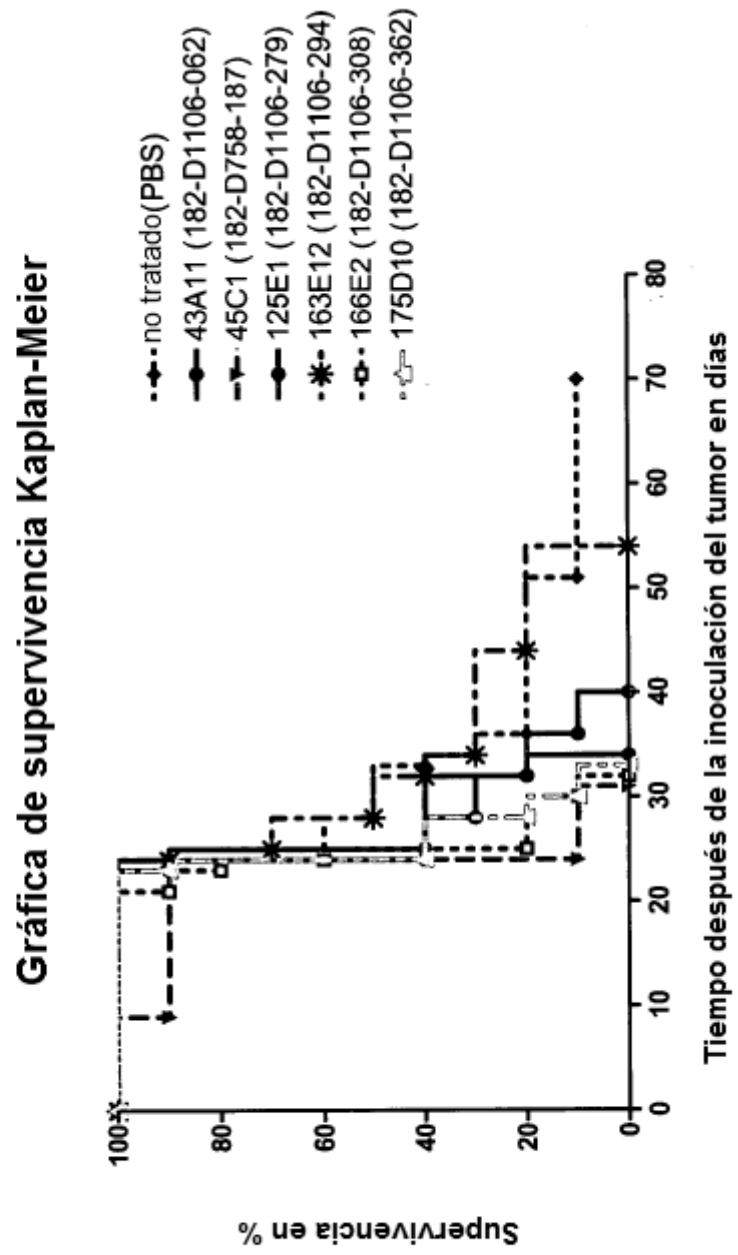
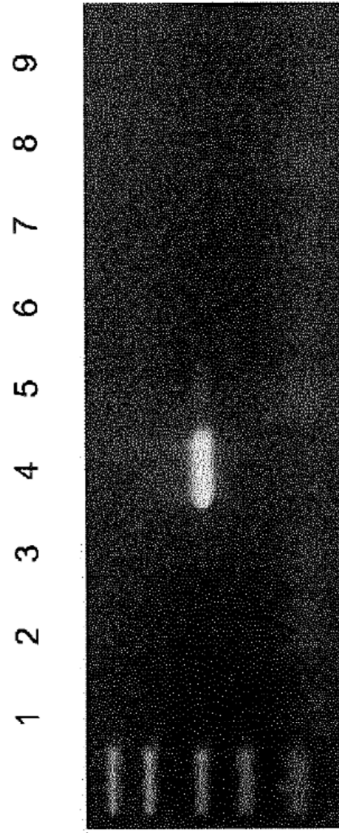


Fig. 28



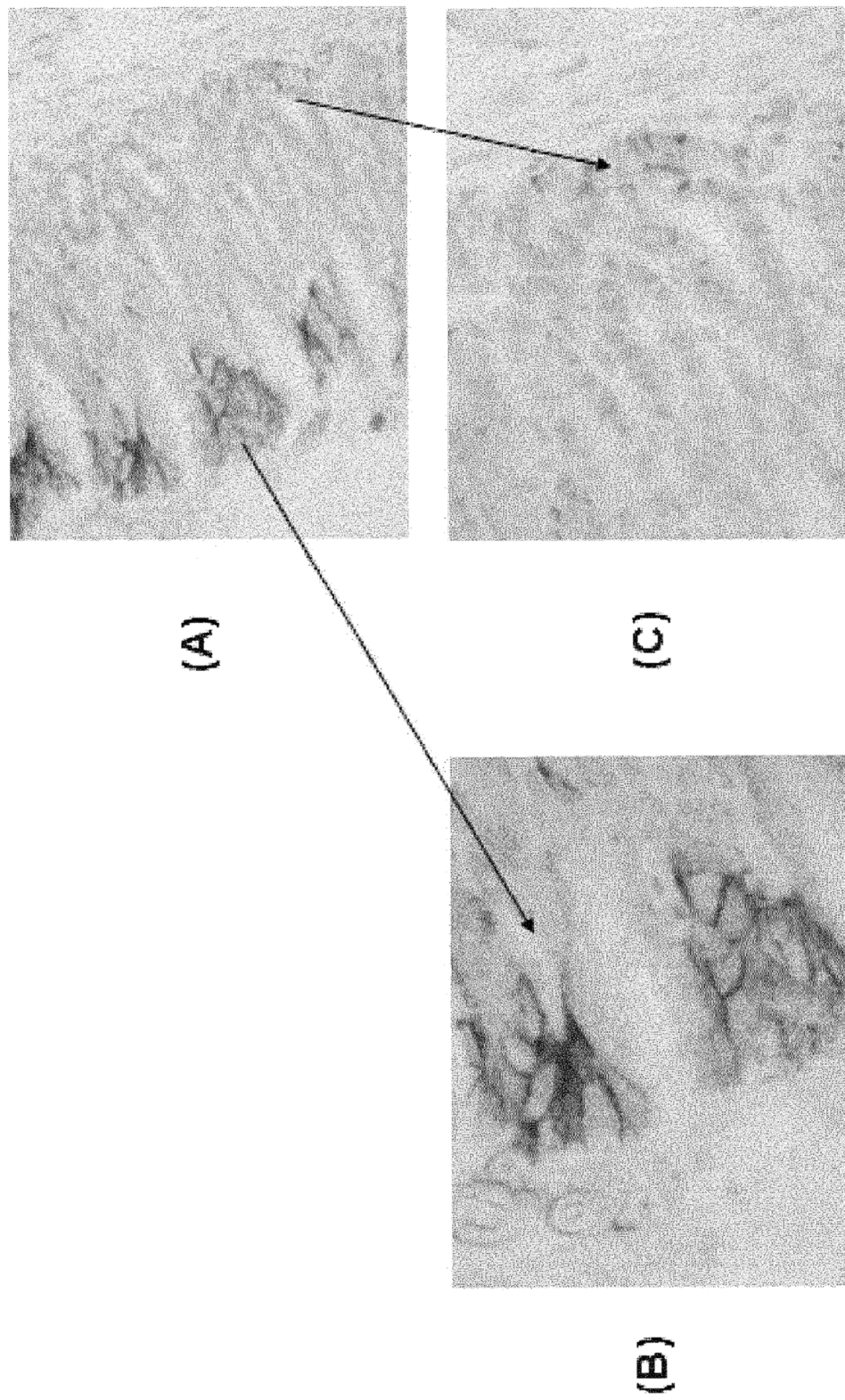
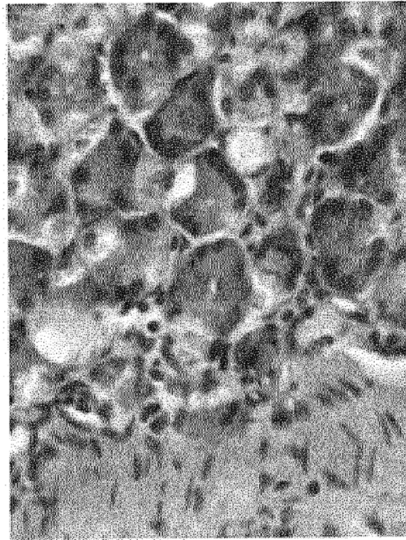


Fig. 29

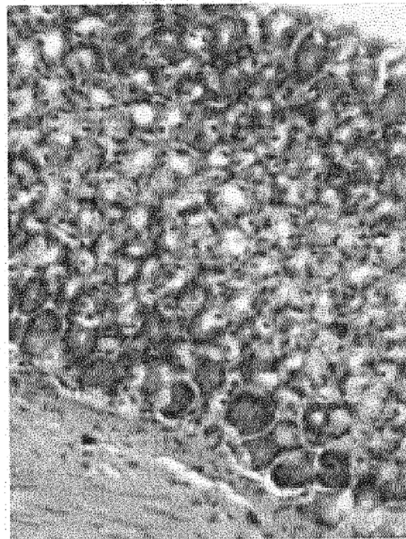
(B)



(D)



(A)



(C)

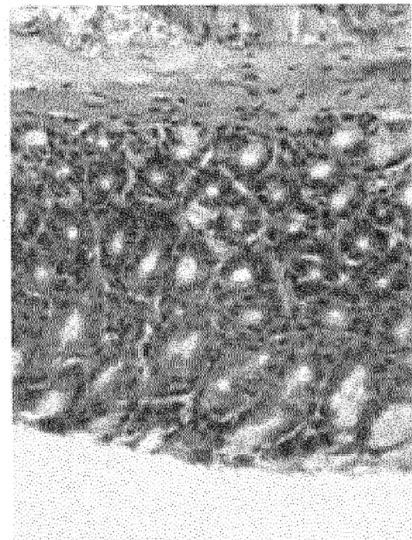


Fig. 30

Fig. 31A

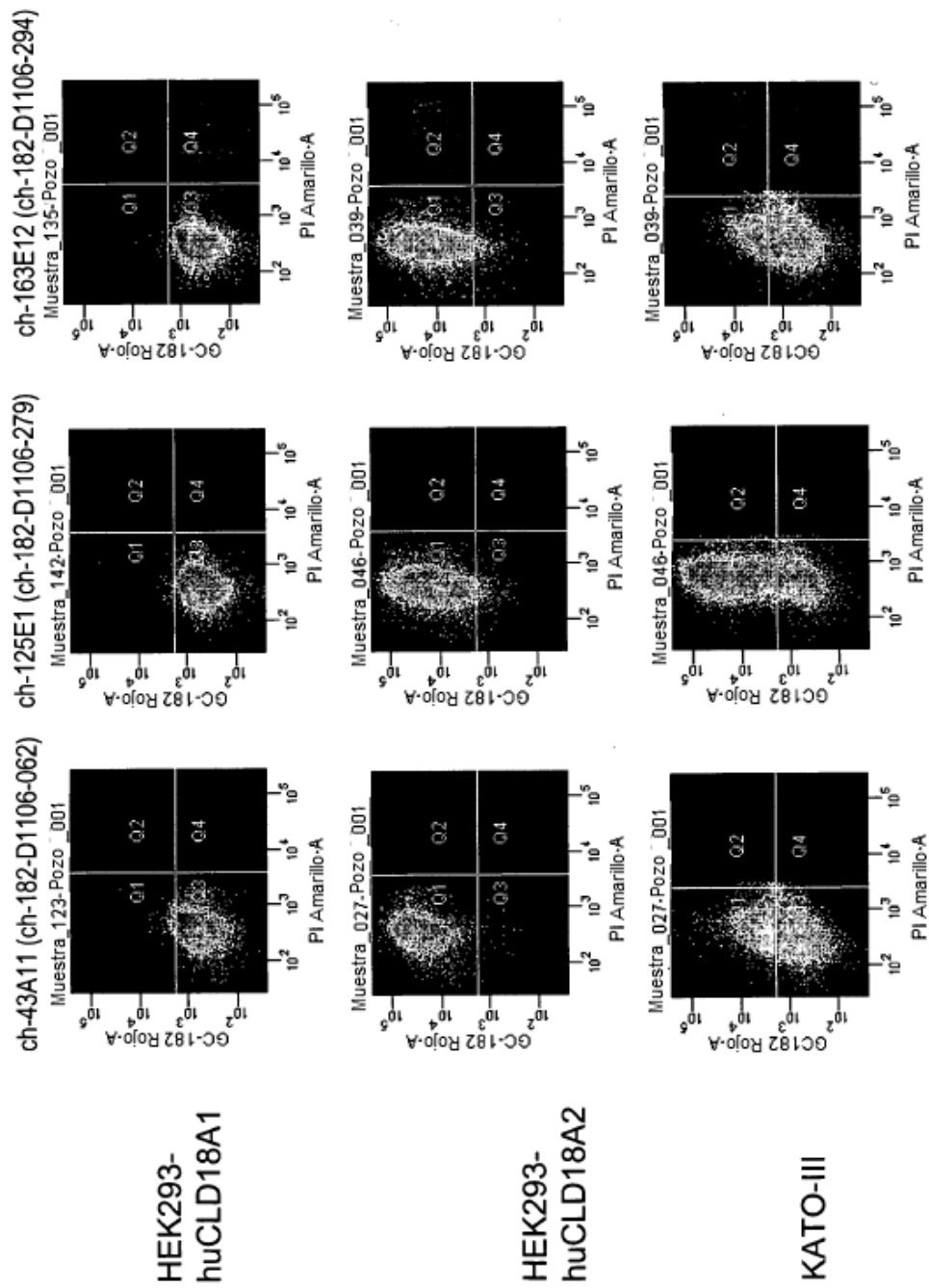


Fig. 31B

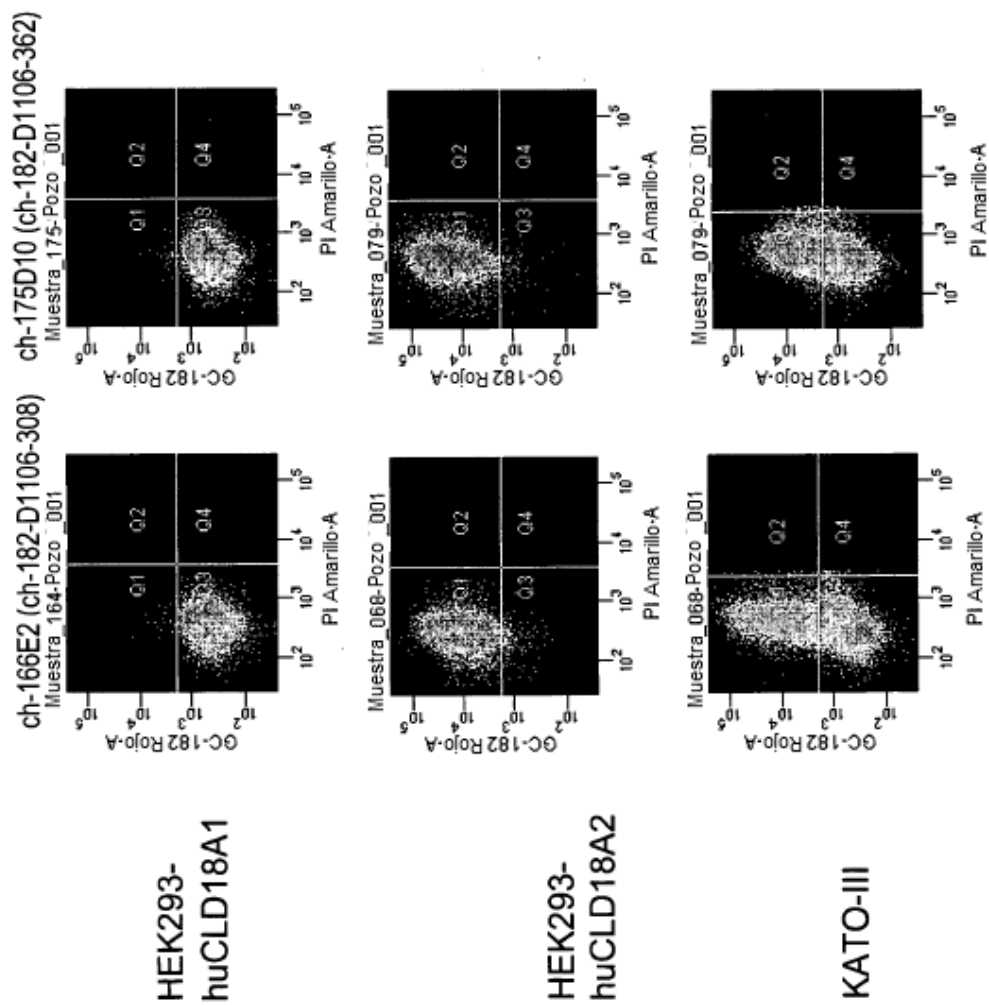


Fig. 32

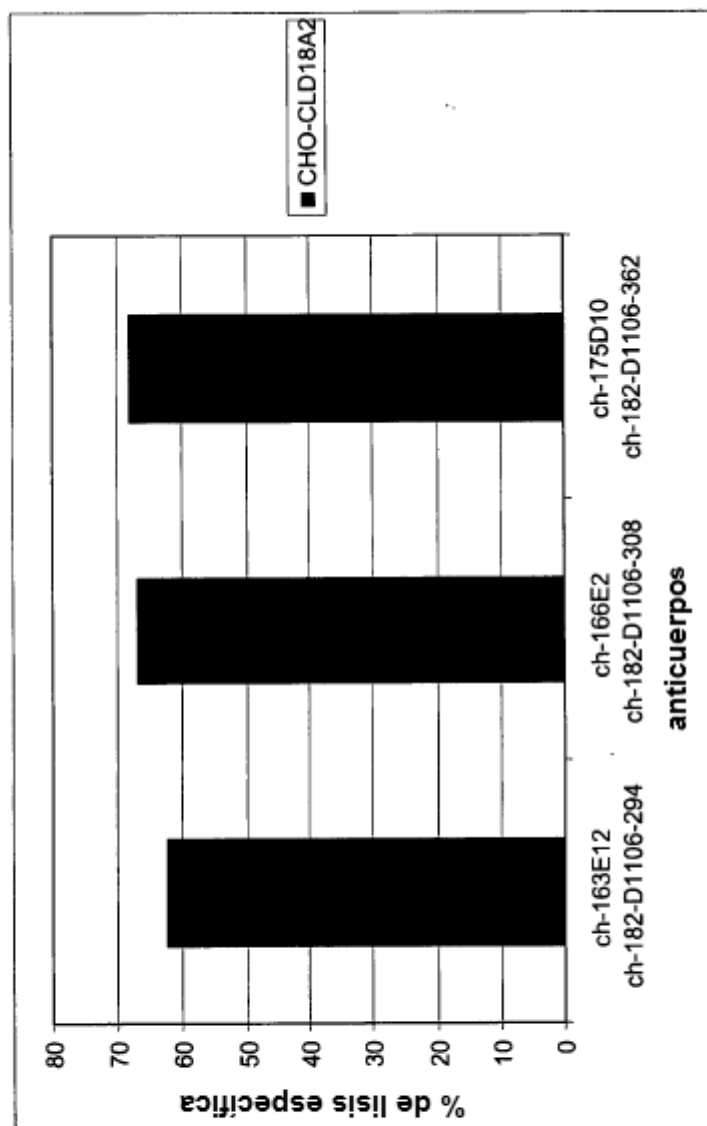


Fig. 33

