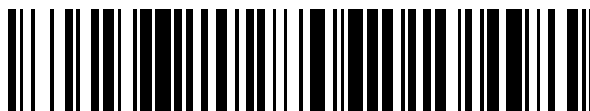


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 609 859**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/JP2012/069842**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018889**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12820225 (6)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.10.2016 EP 2740795**

54 Título: **Composición de fármaco para el tratamiento y/o la prevención del cáncer**

30 Prioridad:

**04.08.2011 JP 2011171379**

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

**24.04.2017**

73 Titular/es:

**TORAY INDUSTRIES, INC. (100.0%)  
1-1, Nihonbashi-Muromachi 2-chome  
Chuo-ku, Tokyo 103-8666, JP**

72 Inventor/es:

**KOBAYASHI SHINICHI;  
OKANO FUMIYOSHI y  
SAITO TAKANORI**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 609 859 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

Composición de fármaco para el tratamiento y/o la prevención del cáncer

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un uso nuevo de un anticuerpo contra CAPRIN-1, o un fragmento del mismo, en un fármaco tal como un agente terapéutico y/o preventivo para el cáncer.

10 **Antecedentes de la técnica**

El cáncer es la principal causa de muerte. Esta enfermedad actualmente se trata principalmente mediante cirugía en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del reciente desarrollo de técnicas quirúrgicas nuevas o del descubrimiento de nuevos agentes antineoplásicos, el tratamiento existente del cáncer tiene unos resultados que no han mejorado suficientemente, a excepción de algunos tipos de cáncer. Con los recientes avances de la biología molecular o de la inmunología del cáncer, se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente con el cáncer, antígenos de cáncer que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos, genes que codifican dichos antígenos de cáncer y similares, aumentando las expectativas de una terapia específica contra el cáncer dirigida a los antígenos del cáncer (Bibliografía no de Patente 1).

Para reducir los efectos secundarios de la terapia contra el cáncer, se desea que los péptidos, los polipéptidos o las proteínas reconocidas como antígenos del cáncer existan raramente en las células normales y existan específicamente en las células cancerosas. En 1991, Boon et al. (Instituto Ludwig para la Investigación del Cáncer, Bélgica) aislaron un antígeno de melanoma humano MAGE1 reconocido por los linfocitos T CD8 positivos mediante un método de clonación de expresión de ADNc usando estirpes celulares de cáncer autólogas y linfocitos T reactivos al cáncer (Bibliografía no de Patente 2). Después, se informó de un método SEREX (identificación serológica de antígenos por clonación de expresión recombinante, por sus siglas en inglés), que adopta una metodología de clonación de expresión génica para identificar antígenos tumorales reconocidos por los anticuerpos producidos en respuesta al cáncer autólogo *in vivo* en un paciente de cáncer (Bibliografía no de Patente 3 y Bibliografía de Patente 1). De acuerdo con este método, se han aislado algunos antígenos de cáncer que raramente se expresan en células normales y que se expresan específicamente en el cáncer (Bibliografías no de Patente 4 a 9). Además, la terapia celular con inmunocitos que reaccionan específicamente con antígenos de cáncer o la inmunoterapia específica del cáncer con vacunas o similares que comprenden antígenos de cáncer están en ensayo clínico dirigido a algunos de los antígenos de cáncer aislados.

En los últimos años, han surgido en el mundo diversos fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer dirigidos a proteínas antigénicas en células cancerosas. Estos fármacos han recibido atención debido a su cierta eficacia como agentes terapéuticos específicos para el cáncer. Una gran mayoría de las proteínas antigénicas diana de los fármacos, sin embargo, también se expresan en células normales. Como resultado de la administración de los anticuerpos, las células normales que expresan los antígenos, así como las células cancerosas, se dañan, dando como resultado desventajoso efectos secundarios. Por tanto, si los antígenos de cáncer expresados específicamente en la superficie de las células cancerosas pueden identificarse y los anticuerpos que se dirigen a los antígenos pueden usarse como fármacos, puede esperarse que estos fármacos de anticuerpo consigan el tratamiento con menos efectos secundarios.

Se ha sabido que la proteína citoplasmática asociada a la activación y la proliferación 1 (CAPRIN-1) es una proteína intracelular que se expresa tras la activación o la división celular de células en reposo normales y forma gránulos de estrés citoplasmático con los ARN intracelulares para participar en la regulación del transporte y la traducción de ARNm. Se ha descubierto que esta proteína se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y por tanto está en estudio como diana de fármacos de anticuerpo para el tratamiento del cáncer (Bibliografía de Patente 2).

**Lista de citas**55 **Bibliografía de Patentes**

Bibliografía de Patente 1: Patente de los EE.UU. N.º 5698396

Bibliografía de Patente 2: WO2010/016526

60 **Bibliografía no de Patente**

Bibliografía no de Patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, vol. 24, págs. 511-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)

Bibliografía no de Patente 2: Bruggen P. et al., *Science*, 254: 1643-1647 (1991)

Bibliografía no de Patente 3: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11810-11813 (1995)

Bibliografía no de Patente 4: *Int. J. Cancer*, 72: 965-971 (1997)

Bibliografía no de Patente 5: *Cancer Res.*, 58: 1034-1041 (1998)  
 Bibliografía no de Patente 6: *Int. J. Cancer*, 29: 652-658 (1998)  
 Bibliografía no de Patente 7: *Int. J. Oncol.*, 14: 703-708 (1999)  
 Bibliografía no de Patente 8: *Cancer Res.*, 56: 4766-4772 (1996)  
 Bibliografía no de Patente 9: *Hum. Mol. Gene* 6: 33-39, 1997

**Sumario de la invención**

Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo que se dirige a CAPRIN-1 expresada específicamente sobre la superficie de células cancerosas y tiene mejor actividad antitumoral que los anticuerpos convencionales y proporcionar el anticuerpo para su uso como agente terapéutico y/o agente preventivo contra el cáncer.

Solución al problema

La presente invención tiene los siguientes aspectos:

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1, comprendiendo el anticuerpo o el fragmento del mismo una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representada por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo biespecífico.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo como principio activo y una combinación farmacéutica como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona dicha composición farmacéutica y dicha combinación farmacéutica, cada una para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.

En una realización de la presente invención, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.

Efectos ventajosos de la invención

Los anticuerpos contra CAPRIN-1 utilizados en la presente invención dañan las células cancerosas. Por tanto, el anticuerpo contra CAPRIN-1 es útil en el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

Descripción de las realizaciones

El anticuerpo contra un polipéptido CAPRIN-1 utilizado en la presente invención puede examinarse por su actividad antitumoral, como se describe más adelante, mediante el examen *in vivo* de la inhibición de la proliferación tumoral en un animal con cáncer o mediante el examen *ex vivo* de la presencia o ausencia de actividad citotóxica mediada por inmunocitos o complemento presentada por el anticuerpo contra las células tumorales que expresan el polipéptido.

El anticuerpo contra CAPRIN-1 utilizado en la presente invención es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína CAPRIN-1. Un anticuerpo monoclonal de este tipo puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda ejercer una actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, los anticuerpos de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, conejo y pollo), anticuerpos recombinantes (por ejemplo, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos monocatenarios (scFv)), anticuerpos humanos y sus fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv). Estos anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante métodos generalmente conocidos por los expertos en la materia. En el caso de un sujeto de ensayo humano, es deseable un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir el rechazo.

El anticuerpo es cualquier clase de molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA, IgD o IgY, o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

El anticuerpo puede modificarse adicionalmente por acetilación, formilación, amidación, fosforilación, PEGilación o similares, además de glicosilación.

En este contexto, la frase "se une específicamente a la proteína CAPRIN-1" significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRIN-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas.

El sujeto que recibe el tratamiento y/o la prevención del cáncer de acuerdo con la presente invención es un mamífero tal como un ser humano, un animal de compañía, ganado o un animal de deporte, preferentemente un ser humano.

En lo sucesivo en el presente documento, se describirán la preparación de antígenos, la preparación de anticuerpos y una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

<Preparación de antígenos para la preparación de anticuerpos>

Las proteínas o los fragmentos de las mismas utilizados como antígenos sensibilizantes para la obtención del anticuerpo contra CAPRIN-1 utilizado en la presente invención no se limitan por los tipos de animales que sirven como su origen, incluyendo seres humanos, perros, ganado, caballos, ratones, ratas y pollos. Las proteínas o los fragmentos de las mismas, sin embargo, se seleccionan preferentemente en vista de la compatibilidad con las células parentales para su uso en la fusión celular. En general, se prefieren proteínas derivadas de mamífero. En particular, se prefieren proteínas derivadas de seres humanos. Por ejemplo, cuando CAPRIN-1 es CAPRIN-1 humana, pueden utilizarse proteínas CAPRIN-1 humanas, péptidos parciales de las mismas o células que expresan CAPRIN-1 humana como antígenos sensibilizantes.

Las secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y homólogos de la misma pueden obtenerse, por ejemplo, accediendo a GenBank (NCBI, EE.UU.) y haciendo uso del algoritmo BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 90: 5873-5877, 1.993; y Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, 1997).

En la presente invención, con referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 o 3) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 o 4) de CAPRIN-1 humana, las dianas son ácidos nucleicos o proteínas que consisten en secuencias que tienen del 70 % al 100 %, preferentemente del 80 % al 100 %, más preferentemente del 90 % al 100 %, aún más preferentemente del 95 % al 100 %, por ejemplo, del 97 % al 100 %, del 98 % al 100 %, del 99 % al 100 % o del 99,5 % al 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos del ORF (marco de lectura abierta, por sus siglas en inglés) o la porción madura de la referencia. En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos al número total de aminoácidos (o bases) cuando dos secuencias se alinean de manera que el grado máximo de similitud o identidad puede conseguirse con o sin huecos introducidos.

Los fragmentos de cada proteína CAPRIN-1 tienen longitudes que van desde la longitud de aminoácidos de un epítipo (o un determinante antigénico), que es la unidad más pequeña reconocida por el anticuerpo, hasta menos que la longitud completa de la proteína. El epítipo se refiere a un fragmento de polipéptido que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, por ejemplo, 8 a 11 aminoácidos.

Los polipéptidos que comprenden las proteínas CAPRIN-1 humanas anteriores y los péptidos parciales de las mismas pueden sintetizarse de acuerdo con métodos de síntesis química, por ejemplo, los métodos de Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (*Seikagaku Jikken Koza* ((*Biochemical Experimentation Course* en Inglés) 1, the Japanese Biochemical Society ed., *Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis*, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). Además, estos polipéptidos pueden sintetizarse mediante métodos habituales utilizando diversos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. Como alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse utilizando metodologías de ingeniería genética conocidos en la técnica (Sambrook et al., *Molecular Cloning*, la segunda edición, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, la tercera edición, *A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons, etc.) y pueden incorporarse en vectores de expresión, que después se introducen en células hospedadoras de modo que las células hospedadoras producen los polipéptidos. De esta manera, pueden obtenerse los polipéptidos de interés.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse fácilmente mediante metodologías de ingeniería genética conocidas en la técnica o métodos habituales utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el mercado. Por ejemplo, un DNA que comprende la secuencia de nucleótidos del gen CAPRIN-1 humano puede prepararse mediante PCR utilizando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como molde y un par de cebadores diseñados de manera que sean capaces de amplificar la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ ID NO: 1. Las condiciones de reacción para esta PCR pueden determinarse de manera apropiada. Los ejemplos de las condiciones pueden incluir, pero no se limitan a, 30 ciclos implicando cada uno las etapas de reacción que consisten en 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (elongamiento) utilizando ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, polimerasa Taq, polimerasa Pfu) y un tampón de PCR que contiene Mg<sup>2+</sup>, seguido de reacción a 72 °C durante 7 minutos. La metodología de PCR, las condiciones, etc., se describen en, por ejemplo, Ausubel et al., *Short*

*Protocols in Molecular Biology*, la 3ª edición, *A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology* (1995), John Wiley & Sons (en particular, el Capítulo 15).

Además, pueden prepararse sondas o cebadores apropiados basándose en información acerca de las secuencias de nucleótidos del gen CAPRIN-1 y las secuencias de aminoácidos de proteínas CAPRIN-1 y pueden utilizarse en la selección de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, una biblioteca de ADNc de este tipo se produce a partir de células, órganos o tejidos que expresan proteínas CAPRIN-1. Los ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos derivados de los testículos o de cánceres o tumores tales como la leucemia, el cáncer de mama, el linfoma, el tumor cerebral, el cáncer de pulmón, el cáncer de páncreas y el cáncer de colon. Estas operaciones, que incluyen la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la selección de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la materia y pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, la segunda edición, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989) y Ausubel et al. (ibid). Los ADN que codifican las proteínas CAPRIN-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas pueden obtenerse a partir del ADN obtenido de este modo.

Las células hospedadoras pueden ser cualquier célula capaz de expresar los polipéptidos anteriores. Los ejemplos de células procariontas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, pero no se limitan a: células de mamífero tales como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una estirpe celular de riñón embrionario humano HEK293; estirpe celular de piel embrionaria de ratón NIH3T3; células de levadura tales como células de levadura en gemación y de levadura de fisión; células de gusano de seda; y células de huevo de *Xenopus*.

En caso de utilizar células procariontas como células hospedadoras, los vectores de expresión utilizados tienen un origen que permite la replicación en las células procariontas, un promotor, un sitio de unión ribosómico, un sitio de multiclonación, un terminador, un gen de resistencia a fármacos, un gen complementario auxotrófico, etc. Los ejemplos de vectores de expresión para *E. coli* pueden incluir la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET y sistemas de expresión pGEX. Los ADN que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que después se transforman las células hospedadoras procariontas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de manera que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células hospedadoras procariontas. A este respecto, los polipéptidos pueden expresarse como proteínas de fusión con otras proteínas.

En caso de utilizar células eucariotas como células hospedadoras, se utilizan vectores de expresión para células eucariotas que tienen un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición de poli(A), etc. como vectores de expresión. Los ejemplos de dichos vectores de expresión pueden incluir los vectores pKa1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, PBK-CMV, PBK-RSV, EBV, ERP, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que anteriormente, los ADN que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que después se transforman las células hospedadoras eucariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de manera que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células hospedadoras eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, los polipéptidos pueden expresarse como diversas proteínas de fusión marcadas con His (por ejemplo, (His)<sub>6</sub>-(His)<sub>10</sub>), marcador FLAG, marcador myc, marcador HA, GFP o similares.

Los vectores de expresión pueden introducirse en las células hospedadoras utilizando métodos bien conocidos tales como electroporación, un método de fosfato de calcio, un método de liposomas, un método de dextrano DEAE, microinyección, infección viral, lipofección y unión con péptidos que penetran en las células.

El polipéptido de interés puede aislarse y purificarse de las células hospedadoras mediante una combinación de operaciones de separación conocidas en la técnica. Los ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, el tratamiento con un desnaturalizante (por ejemplo, urea) o un detergente, ultrasonidos, digestión enzimática, precipitación de proteínas (por adición de sal), fraccionamiento y precipitación con disolventes, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.

<Estructura de los anticuerpos>

Los anticuerpos son por lo general glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas distintas de IgM son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa cada una compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada a través de un único enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas varía entre los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras también tiene un enlace disulfuro intracatenario. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (la región VL) en un extremo y tiene una sola región constante en el otro extremo. La región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante

de la cadena pesada, mientras que el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las regiones particulares denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables de los anticuerpos presentan variabilidad específica y transmiten especificidad de unión al anticuerpo. Las porciones relativamente conservadas de las regiones variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables completos de la cadena ligera y pesada comprenden cada uno cuatro FR conectadas a través de tres CDR. Estos tres CDR se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la cadena pesada. Análogamente, las CDR se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR de cada cadena se mantienen cerca entre sí por las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR de la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión anticuerpo-antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, por ejemplo, la implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fc $\gamma$ , la semivida/tasa de aclaramiento mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q de la cascada del complemento.

<Preparación de los anticuerpos>

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención significa un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1 de longitud completa o un fragmento de la misma.

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo de unirse al antígeno CAPRIN-1 *in vivo*. A través de dicha unión, el anticuerpo ejerce la función de dañar (por ejemplo, destruir, suprimir o hacer retroceder) el tumor. Específicamente, el anticuerpo utilizado en la presente invención no está limitado por su tipo siempre que el anticuerpo pueda dañar los tumores tales como el cáncer de mama, el cáncer de riñón, el cáncer de páncreas, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el tumor cerebral, el cáncer de estómago, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga urinaria, el cáncer de esófago, la leucemia, el linfoma, el fibrosarcoma, el mastocitoma o el melanoma como resultado de la unión a la proteína CAPRIN-1.

En lo sucesivo en el presente documento, se mostrarán ejemplos de preparación de diversos anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo, se administran estirpes celulares de cáncer de mama SK-BR-3 que expresan CAPRIN-1 a cada ratón para su inmunización. El bazo se extrae de este ratón. Después de la separación de las células del bazo, las células se fusionan con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto antiproliferativo sobre una célula cancerosa se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridomas). Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto antiproliferativo sobre una célula cancerosa se aíslan y se cultivan. El anticuerpo puede prepararse mediante la purificación a partir del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un método general de purificación por afinidad.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales pueden prepararse, por ejemplo, como se indica a continuación: primero, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización implica generalmente inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea los antígenos sensibilizantes a los mamíferos. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen con o se suspenden en PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similares en una cantidad apropiada y después se mezclan, si se desea, con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante de Freund completo. Después de la emulsión, la emulsión resultante se administra a cada uno de mamíferos varias veces cada 4 a 21 días. Como alternativa, puede utilizarse un vehículo apropiado para la inmunización con antígenos sensibilizantes.

Después de la confirmación de un aumento en el nivel del anticuerpo deseado en el suero del mamífero inmunizado de este modo, se recogen los inmunocitos del mamífero y se someten a fusión celular. Los ejemplos preferidos de inmunocitos en particular incluyen las células del bazo.

Se utilizan células de mieloma de mamífero como células parentales compañeras que se fusionan con los inmunocitos. Para las células de mieloma, se utilizan preferentemente diversas estirpes celulares conocidas en la técnica, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (*J. Immunol.* (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (*Current Topics in Microbiology and Immunology* (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. *Eur. J. Immunol.* (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., *Cell* (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., *Nature* (1978) 276, 269-270), FO (deST. Groth, SF et al., *J. Immunol Methods* (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., *J. Exp. Med.* (1978) 148, 313-323) y R210 (Galfre, G. et al., *Nature* (1979) 277, 131-133).

La fusión celular entre los inmunocitos y las células de mieloma puede realizarse básicamente de acuerdo con un método conocido en la técnica, por ejemplo, el método de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C. *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46).

Más específicamente, la fusión celular se realiza, por ejemplo, en presencia de un promotor de la fusión celular en

un medio nutriente convencional. Por ejemplo, se utiliza polietilenglicol (PEG) o virus hemaglutinante de Japón (HVJ) como el promotor de la fusión. Si se desea, puede añadirse adicionalmente un auxiliar tal como dimetilsulfóxido con el fin de potenciar la eficiencia de la fusión.

5 La relación entre los inmunocitos y las células de mieloma utilizadas puede establecerse arbitrariamente. Por ejemplo, la cantidad de los inmunocitos se establece preferentemente en 1 a 10 veces la cantidad de las células de mieloma. Los ejemplos del medio que puede utilizarse en la fusión celular incluyen los medios RPMI1640 y MEM adecuados para el crecimiento de las estirpes celulares de mieloma, así como los medios convencionales para su uso en este tipo de cultivo celular. Además, puede utilizarse un complemento de suero tal como suero de ternera fetal (FCS) en combinación con estas células.

15 Para la fusión celular, los inmunocitos y las células de mieloma se mezclan bien en una cantidad predeterminada del medio. Por lo general se añade una solución de PEG (peso molecular promedio: por ejemplo, aproximadamente de 1000 a 6000) precalentada a aproximadamente 37 °C a la mezcla a una concentración del 30 al 60 % (p/v) y se mezcla con la misma para formar los hibridomas de interés. Posteriormente, se repiten los procedimientos de añadir secuencialmente un medio apropiado y retirar el sobrenadante por centrifugación para retirar los agentes de fusión celular o similares, desfavorables para el crecimiento de los hibridomas.

20 Los hibridomas obtenidos de este modo se cultivan en un medio selectivo convencional, por ejemplo, un medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) para la selección. El cultivo en el medio HAT continúa durante un período (por lo general, de varios días a varias semanas) suficiente para la muerte de las células distintas de los hibridomas de interés (células no fusionadas). Posteriormente, los hibridomas que producen el anticuerpo de interés se exploran para detectar, y se clonan como, clones individuales mediante un método de dilución limitante convencional.

25 Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de los animales no humanos con antígenos, pueden obtenerse hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (por ejemplo, actividad antiproliferativa celular) mediante la sensibilización de linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados por el virus de EB, con proteínas, células que expresan proteínas o lisados de las mismas *in vitro* y la fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas de seres humanos capaces de dividirse de forma permanente, por ejemplo, U266 (n.º de registro TIB 196).

35 Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales preparados de este modo pueden subcultivarse en un medio convencional y también pueden almacenarse durante un período largo en nitrógeno líquido.

Específicamente, los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados se utilizan como antígenos sensibilizantes en la inmunización de acuerdo con un método de inmunización convencional. Los inmunocitos obtenidos se fusionan con células parentales conocidas en la técnica de acuerdo con un método de fusión celular convencional. Pueden seleccionarse células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante un método de selección convencional para preparar el anticuerpo.

45 En este contexto, por ejemplo, los ratones KM (Kirin Pharma Co., Ltd./Medarex) y los ratones Xeno (Amgen Inc.) se conocen como los ratones productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, Publicaciones Internacionales N.º WO02/43478 y WO02/092812). Pueden obtenerse anticuerpos policlonales humanos completos de la sangre de dichos ratones inmunizados con proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de las mismas. Como alternativa, pueden aislarse células de bazo de los ratones inmunizados de este modo y fusionarse con células de mieloma. De esta manera, pueden obtenerse anticuerpos monoclonales humanos.

50 Los antígenos pueden prepararse de acuerdo con, por ejemplo, un método que utiliza células animales (Publicación de Patente Japonesa (Kohyo) N.º 2007-530068) o un método que utiliza baculovirus (por ejemplo, Publicación Internacional N.º WO98/46777). Los antígenos que tienen baja inmunogenicidad pueden unirse a macromoléculas inmunogénicas tales como la albúmina para la inmunización.

55 Como alternativa, pueden utilizarse anticuerpos recombinantes, que se producen utilizando una técnica de recombinación génica que implica: la clonación de los genes de anticuerpos a partir de hibridomas; la incorporación de los genes de anticuerpos en vectores apropiados; y la introducción de los vectores en hospedadores (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers Ltd, 1990). Específicamente, se sintetiza ADNc de la región variable del anticuerpo (región V) a partir de los ARNm de hibridomas utilizando la transcriptasa inversa. Después de la obtención de los ADN que codifican las regiones V del anticuerpo de interés, los ADN se ligan con ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos (regiones C) deseadas. Los productos resultantes de la ligadura se incorporan entonces en vectores de expresión. Como alternativa, pueden incorporarse ADN que codifican la región V del anticuerpo en vectores de expresión que contienen ADN de la región C del anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión de manera que se expresan bajo el control de regiones de control de la expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. Después, las células hospedadoras pueden transformarse con los vectores de expresión resultantes y se las puede dejar expresar anticuerpos.

Como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es cualquiera de diversos anticuerpos monoclonales incluyendo anticuerpos monoclonales animales no humanos, anticuerpos monoclonales humanos y anticuerpos recombinantes.

5 Estos anticuerpos monoclonales animales no humanos o anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante el cultivo de hibridomas obtenidos mediante la fusión entre las células de bazo de animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratones productores de anticuerpos humanos, pollos o conejos) inmunizados con proteínas CAPRIN-1 y células de mieloma.

10 El anticuerpo recombinante incluye, como se ha descrito anteriormente, los anticuerpos quiméricos, los anticuerpos humanizados, los anticuerpos monocatenarios, los anticuerpos multiespecíficos y similares.

El anticuerpo quimérico puede prepararse mediante: ligadura de los ADN que codifican regiones variables de la cadena ligera o pesada de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo) con los ADN que codifican regiones constantes de la cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano; la incorporación de los genes de fusión resultantes en vectores de expresión; y la introducción de los vectores en hospedadores de manera que se producen anticuerpos.

20 Específicamente, el anticuerpo quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto de regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo de ratón y la región constante de las cadenas pesada y ligera de anticuerpos humanos. El anticuerpo quimérico puede prepararse usando un método conocido en la técnica que implica, por ejemplo: la ligadura de ADN que codifican regiones V de anticuerpo de ratón con los ADN que codifican regiones C de anticuerpo humano; la incorporación de los productos de ligadura resultantes en vectores de expresión; y la introducción de los vectores en hospedadores de manera que se producen anticuerpos. En los Ejemplos que se describen más adelante, se prepararon anticuerpos quiméricos humanos-de ratón y se confirmó que tenían un efecto antitumoral. Estos anticuerpos monoclonales comprenden una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8 y una variable región de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12, en el que la región VH comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7, y la región VL comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

35 El anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano reformado, es un anticuerpo obtenido por ingeniería genética. El anticuerpo humanizado se construye mediante el injerto de CDR de un anticuerpo humano con CDR correspondientes a un anticuerpo derivado de un animal inmunizado. Específicamente, se preparan ADN en los que las secuencias que codifican CDR en los ADN que codifican una región variable de la cadena ligera o pesada derivada de anticuerpo de origen humano están sustituidos por las correspondientes secuencias que codifican CDR de un anticuerpo derivado de animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o de pollo), y se ligan con los ADN que codifican regiones constantes de la cadena ligera o pesada derivada de anticuerpo humano. Los genes de fusión resultantes pueden incorporarse en vectores de expresión, que después se introducen en hospedadores para la producción de anticuerpos para preparar el anticuerpo humanizado de interés.

45 Específicamente, por ejemplo, se sintetizan secuencias de ADN diseñadas con el fin de enlazar CDR de anticuerpos de ratón y pollo y regiones marco conservadas de anticuerpo humano (FR), mediante PCR, utilizando varios oligonucleótidos preparados que tienen porciones terminales superpuestas entre sí. Los ADN obtenidos se ligan con ADN que codifican regiones constantes de anticuerpo humano. Posteriormente, los productos de ligadura resultantes se incorporan en vectores de expresión, que después se introducen en hospedadores para la producción de anticuerpos para obtener el anticuerpo de interés (véase la Publicación de Solicitud de Patente Europea N.º EP239400 y la Publicación Internacional N.º WO96/02576). Las FR de anticuerpo humano conectadas a través de CDR se seleccionan de manera que las CDR forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos de las regiones marco conservadas de las regiones variables del anticuerpo pueden sustituirse de manera que las CDR del anticuerpo humano reformado resultante formen un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al, *Cancer Research* 1993, 53: 851-856). Además, estas regiones marco pueden reemplazarse por regiones marco derivadas de diversos anticuerpos humanos (véase la Publicación Internacional N.º WO99/51743).

60 Las regiones marco conservadas de anticuerpo humano conectadas a través de CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en las regiones marco conservadas de las regiones variables del anticuerpo pueden sustituirse de manera que las CDR del anticuerpo humano reformado resultante formen un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al., *Cancer Research* 1993, 53: 851-856).

65 El anticuerpo monocatenario se refiere a un anticuerpo o al fragmento del mismo que comprende regiones variables de cadenas pesadas y ligeras vinculadas linealmente entre sí a través de un enlazador. Un ADN que codifica el anticuerpo monocatenario puede prepararse mediante la ligadura de un ADN que codifica la región variable de la



cadena pesada, un ADN que codifica el enlazador y un ADN que codifica la región variable de la cadena ligera. En este contexto, las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras se derivan ambas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que solo tiene las CDR sustituidas por las CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consiste en de 12 a 19 aminoácidos.

5 Los ejemplos de los mismos incluyen  $(G_4S)_3$  que consiste en 15 aminoácidos (G. B. Kim et al., *Protein Engineering Design and Selection* 2007, 20 (9): 425-432).

El anticuerpo multiespecífico se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a una pluralidad de diferentes epítomos. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico (diacuerpo) es capaz de unirse específicamente a dos epítomos diferentes. Un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico puede prepararse mediante ligadura, por ejemplo, de un ADN que codifica una región variable A de la cadena pesada, un ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera, un ADN que codifica una región variable B de la cadena pesada y un ADN que codifica una región variable A de la cadena ligera en este orden (siempre que el ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera y el ADN que codifica una región variable B de la cadena pesada se ligan a través de un ADN que codifica un enlazador como se ha descrito anteriormente). En este contexto, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se derivan todas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que tiene humanos solo las CDR sustituidos por las CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo).

20 Los aminoácidos en las regiones variables (por ejemplo, FR) o las regiones constantes del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado preparado de este modo pueden sustituirse por otros aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos es la sustitución de, por ejemplo, menos de 15, menos de 10, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos aminoácidos, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos, más preferentemente de 1 o 2 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debe ser funcionalmente equivalente a un anticuerpo no sustituido. La sustitución es, de forma deseable, una sustitución de aminoácidos conservativa, que es la sustitución entre aminoácidos similares en propiedades tales como la carga, las cadenas laterales, la polaridad y la aromaticidad. Los aminoácidos pueden clasificarse en términos de propiedades similares en, por ejemplo: aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína y tirosina); aminoácidos no polares (leucina, isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina); aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina).

Los ejemplos de anticuerpos modificados pueden incluir anticuerpos unidos con diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). En el anticuerpo modificado de la presente invención, la sustancia que se une no está limitada. Con el fin de obtener un anticuerpo modificado de este tipo, el anticuerpo obtenido puede modificarse químicamente. Ya se ha establecido un método para ello en la técnica.

En este contexto, la frase "funcionalmente equivalente" significa que un anticuerpo de interés tiene una actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente, el anticuerpo de interés tiene la función de dañar el tumor y esencialmente no provoca ningún rechazo cuando se aplica a los seres humanos, por ejemplo. Los ejemplos de dicha actividad pueden incluir la actividad antiproliferativa y la actividad de unión.

Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido, que implica introducir una mutación en un polipéptido, es bien conocido para los expertos en la materia. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden introducir apropiadamente una mutación en el anticuerpo de la presente invención usando mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh, T. et al., (1995) *Gene* 152: 271-275; Zoller, M. J. y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.*, 100: 468-500; Kramer, W. et al., (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, H. J., (1987) *Methods Enzymol.*, 154: 350-367; Kunkel, T. A., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.*, 85: 2763-2766) o similar, para preparar de ese modo un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo que reconoce un epítomo de una proteína CAPRIN-1 reconocido por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 descrito anteriormente puede obtenerse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, el anticuerpo puede obtenerse mediante un método que consiste en la determinación del epítomo de la proteína CAPRIN-1 reconocido por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 mediante un método convencional (por ejemplo, cartografiado de epítomos) y la preparación de un anticuerpo utilizando un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en el epítomo como inmunógeno, o un método que implica la determinación de un epítomo para un anticuerpo preparado mediante un método convencional y la selección de un anticuerpo que reconoce el mismo epítomo que aquel para el anticuerpo anti-CAPRIN-1.

El anticuerpo de la presente invención tiene una constante de afinidad  $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ) de preferentemente al menos  $10^7$   $M^{-1}$ , al menos  $10^8$   $M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^8$   $M^{-1}$ , al menos  $10^9$   $M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^9$   $M^{-1}$ , al menos  $10^{10}$   $M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{10}$   $M^{-1}$ , al menos  $10^{11}$   $M^{-1}$ , al menos  $5 \times 10^{11}$   $M^{-1}$ , al menos  $10^{12}$   $M^{-1}$  o al menos  $10^{13}$   $M^{-1}$ .

El anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un agente antitumoral. La conjugación del anticuerpo con el agente antitumoral puede realizarse a través de un espaciador que tiene un grupo (por ejemplo, un grupo succinimidilo, un grupo formilo, un grupo 2-piridilditio, un grupo maleimidilo, un grupo alcoxycarbonilo o un grupo hidroxilo) reactivo con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o similares.

5 Los ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en la bibliografía, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, pipsulfán, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, bulatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, esponjistatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolinico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulinico, eniluracilo, amsacrina, bestabucilo, bisantreno, edatraxato, defosfamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilinico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxana, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromán, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatraxato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, inhibidores de irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los mismos.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente antitumoral para producir un efecto terapéutico mayor. Esta metodología es adaptable a un paciente con cáncer que expresa CAPRIN-1 ya sea antes o después de la operación quirúrgica. Esta metodología puede aplicarse, en particular, después de la cirugía, al cáncer que expresa CAPRIN-1, que se ha tratado convencionalmente con un agente antitumoral solo, para producir una mayor prevención de la reaparición del cáncer o una prolongación del tiempo de supervivencia.

Ejemplos del agente antitumoral utilizados en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en la bibliografía, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, pipsulfán, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, bulatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, esponjistatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomina, porfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, encitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitiostano y testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolinico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulinico, eniluracilo, amsacrina, bestabucilo, bisantreno, edatraxato, defosfamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilinico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxana, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromán, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatraxato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, inhibidores de irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales farmacéuticamente aceptables (conocidas en la técnica) y derivados (conocidos en la técnica) de los mismos. De estos agentes antitumorales, se utilizan en particular preferentemente ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede estar unido a un radioisótopo públicamente conocido en la bibliografía, etc., tal como <sup>211</sup>A, <sup>131</sup>I, <sup>125</sup>I, <sup>90</sup>Y, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>153</sup>Sm, <sup>212</sup>Bi, <sup>32</sup>P, <sup>175</sup>Lu o <sup>176</sup>Lu. Deseablemente, se utiliza un radioisótopo eficaz para el tratamiento o el diagnóstico del tumor.

5 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con CAPRIN-1, un anticuerpo que reconoce específicamente CAPRIN-1 o un anticuerpo que se une específicamente a CAPRIN-1 y muestra una actividad citotóxica o un efecto antiproliferativo sobre el cáncer. El anticuerpo debe tener una estructura que provoque poco o ningún rechazo en animales receptores. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos humanos-de ratón), anticuerpos monocatenarios y anticuerpos biespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos (1) tienen regiones variables de cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo humano, (2) tienen regiones variables con CDR (CDR1, CDR2 y CDR3) de cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo de animal no humano y regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano o (3) estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo animal no humano y regiones constantes de la cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo de la presente invención es preferentemente el anticuerpo (1) o (2).

Dichos anticuerpos recombinantes pueden prepararse como se indica a continuación: se clonan ADN que codifican anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales humanos, de ratón, de rata, de conejo y de pollo) contra CAPRIN-1 humana a partir de células productoras de anticuerpos tales como hibridomas y se utilizan como moldes en RT-PCR o similares para preparar los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas en los anticuerpos. Las secuencias respectivas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas y las respectivas secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cada región se determinan sobre la base del sistema de numeración EU Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Servicio de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud, Bethesda, Md. (1991)).

Un ADN de este tipo que codifica cada región variable o un ADN que codifica cada CDR se prepara utilizando una técnica de recombinación génica (Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. En este contexto, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos pueden prepararse mediante la inmunización de animales que producen anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) con CAPRIN-1 humana y después la fusión de células de bazo extirpadas de los animales inmunizados con células de mieloma. Aparte de esto, se preparan ADN que codifican regiones constantes y variables de la cadena ligera o pesada derivadas de anticuerpo humano, en caso necesario, utilizando una técnica de recombinación génica o un sintetizador de ADN.

Los ADN recombinantes preparados pueden incorporarse en uno o más vectores apropiados, que después se introducen en las células hospedadoras (por ejemplo, células de mamífero, células de levadura y células de insecto) para que los ADN se (co)expresen para producir anticuerpos recombinantes (P. J. Delves., *ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES*, 1997 WILEY, P. Shepherd y C. Dean, *Monoclonal Antibodies*, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; y J. W. Goding, *Monoclonal Antibodies: principles and practice*, 1993 ACADEMIC PRESS).

Los ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluyen los siguientes anticuerpos (a) obtenidos en los Ejemplos que se describen más adelante:

(a) un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 (por ejemplo, un anticuerpo compuesto de una región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y una región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12).

En este contexto, las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo de ratón. Las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de ratón.

Los ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo monocatenario o el anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos (i), (ii) y (iii):

(i) un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas derivadas de una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo humano que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano;

(ii) un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que

comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano, una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano, una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano y una región constante de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano; y

(iii) un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8, una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano, una región variable de la cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una región constante de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano.

Las secuencias de las regiones constantes y variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos humanos están disponibles de, por ejemplo, NCBI (EE.UU.; GenBank, UniGene, etc.). Por ejemplo, puede hacerse referencia a las siguientes secuencias: n.º de registro J00228 para una región constante de una cadena pesada de IgG1 humana; n.º de registro J00230 para una región constante de una cadena pesada de IgG2 humana; n.º de registro X03604 para una región constante de una cadena pesada de IgG3 humana; n.º de registro K01316 para una región constante de una cadena pesada de IgG4 humana; n.º de registro V00557, X64135 y X64133 para una región constante de una cadena ligera  $\kappa$  humana; y n.º de registro X64132 y X64134 para una región constante de una cadena ligera  $\lambda$  humana.

Preferentemente, estos anticuerpos tienen actividad citotóxica y de ese modo pueden ejercer un efecto antitumoral.

Las secuencias particulares anteriores de las regiones variables y las CDR de las cadenas pesadas y ligeras de cada anticuerpo se proporcionan meramente con fines ilustrativos. Es obvio que el anticuerpo de la presente invención no está limitado por las secuencias particulares. Se preparan hibridomas capaces de producir anticuerpos humanos anti-CAPRIN-1 humana o anticuerpos de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos de ratón) diferentes de los descritos anteriormente y los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se recuperan y se evalúan para determinar si son (o no son) los anticuerpos de interés con actividad de unión inmunológica frente a CAPRIN-1 humana y actividad citotóxica como índices. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales de interés se identifican de este modo. Después, se producen ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de interés a partir de los hibridomas y se secuencian, como se ha descrito anteriormente. Los ADN se utilizan para la preparación de los diferentes anticuerpos.

El anticuerpo descrito anteriormente puede ser el anticuerpo (a) que tiene la sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, en particular en una secuencia de una región marco conservada y/o una región constante, siempre que el anticuerpo tenga una especificidad de manera que pueda reconocer específicamente a CAPRIN-1. En este contexto, el término "varios" significa preferentemente de 2 a 5, más preferentemente 2 o 3.

La presente invención proporciona adicionalmente un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención, un ADN que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo o un ADN que codifica la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Dicho ADN incluye, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera que comprende las secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, en el caso del anticuerpo (a).

Las CDR codificadas por el ADN que tiene estas secuencias sirven como regiones que determinan la especificidad del anticuerpo. Las secuencias que codifican las otras regiones (es decir, las regiones constantes y las regiones marco conservadas) del anticuerpo, por tanto, pueden ser secuencias derivadas de otros anticuerpos. En este contexto, "otros anticuerpos" también incluyen anticuerpos derivados de organismos no humanos y son, preferentemente, los derivados de seres humanos desde el punto de vista de la reducción de efectos secundarios. Específicamente, el ADN de la presente invención comprende preferentemente secuencias de nucleótidos que codifican las correspondientes secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpos humanos de regiones que codifican cada región marco conservada y cada región constante de las cadenas pesadas y ligeras.

Los ejemplos adicionales de ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluyen un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12. En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 13. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 es, por ejemplo, la

secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 14. En un ADN de este tipo, una región que codifica cada región constante de las cadenas pesadas y ligeras debe comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente derivada de un anticuerpo humano.

5 Estos ADN de anticuerpos pueden obtenerse, por ejemplo, mediante los métodos descritos anteriormente o el siguiente método: primero, se preparan ARN totales a partir de hibridomas relacionados con el anticuerpo de la presente invención usando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado y los ADNc se sintetizan utilizando la transcriptasa inversa y cebadores aleatorios o similares. Posteriormente, los ADNc que codifican el anticuerpo se amplifican por PCR utilizando cebadores de oligonucleótidos para secuencias conservadas de cada región variable  
10 en genes de la cadena pesada y ligera de anticuerpos de ratón conocidos. Pueden obtenerse secuencias que codifican las regiones constantes mediante la amplificación por PCR de secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos del ADN puede incorporarse en un plásmido o un fago para la secuenciación, por ejemplo, y puede determinarse de acuerdo con un método habitual.

15 El efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRIN 1 utilizado en la presente invención en células cancerosas que expresan CAPRIN-1 parece estar provocado por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por células efectoras (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra las células que expresan CAPRIN-1.

20 Se sabe que el efecto antitumoral basado en el mecanismo se relaciona con el número de moléculas diana de unión a anticuerpo expresadas sobre la superficie de las células cancerosas (Niwa R., *Clinical Cancer Research* 2005, 15 de marzo; 11 (6): 2327-2336). El número de moléculas diana expresadas en la superficie de las células cancerosas puede examinarse usando un kit de ensayo existente capaz de medir el número de moléculas en la superficie celular. En concreto, el número de moléculas diana de unión a anticuerpo puede determinarse: haciendo reaccionar  
25 las células cancerosas con, por ejemplo, anticuerpos contra las moléculas diana como anticuerpos primarios; haciendo reaccionar las mismas con anticuerpos marcados con fluorescencia contra los anticuerpos primarios, junto con perlas de curva de calibración con el número de moléculas conocido preliminarmente; midiendo la intensidad de fluorescencia media de las muestras; y determinando el número de las moléculas diana basándose en la curva de calibración obtenida.

30 Por tanto, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 utilizado en la presente invención puede evaluarse para determinar su actividad mediante la determinación *ex vivo* de la actividad ADCC o la actividad CDC contra células cancerosas que expresan CAPRIN-1 o mediante el examen del número de moléculas de CAPRIN-1 expresadas en la superficie de las células cancerosas en el caso de usar el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención como  
35 anticuerpo primario como se muestra específicamente a continuación en los Ejemplos.

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 utilizado en la presente invención se une a proteínas CAPRIN-1 en las células cancerosas y presenta un efecto antitumoral a través de la actividad. Por tanto, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es presumiblemente útil en el tratamiento o la prevención del cáncer. Específicamente, la  
40 presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que comprende el anticuerpo anti-CAPRIN-1 como principio activo. El anticuerpo anti-CAPRIN-1 utilizado con el fin de la administración a los cuerpos humanos (terapia de anticuerpos) es preferentemente un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

45 El anticuerpo anti-CAPRIN-1 con una mayor afinidad de unión para una proteína CAPRIN-1 en la superficie de células cancerosas ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por tanto, puede esperarse un efecto antitumoral más fuerte si puede obtenerse el anticuerpo anti-CAPRIN-1 que tiene alta afinidad de unión por la proteína CAPRIN-1. Un anticuerpo de este tipo es adaptable a una composición farmacéutica que tiene por objeto el tratamiento y/o la prevención del cáncer. De forma deseable, dicha alta afinidad de unión es preferentemente al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, al  
50 menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^9$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{11}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^{11}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup> o al menos  $10^{13}$  M<sup>-1</sup>, en términos de una constante de asociación (constante de afinidad)  $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ), como se ha descrito anteriormente.

La unión de anticuerpos anti-CAPRIN-1 a un número mayor de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de células cancerosas produce una actividad antitumoral más fuerte. Deseablemente, el número de moléculas de CAPRIN-1 a las que se unen los anticuerpos para el efecto antitumoral esperado es de  $10^4$  o más, preferentemente de  $10^5$  o más moléculas de CAPRIN-1 por célula cancerosa, medido usando el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención.  
55

60 <Unión a células que expresan el antígeno>

La capacidad del anticuerpo para unirse a CAPRIN-1 puede determinarse mediante el uso de un ensayo de unión, por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, inmunofluorescencia y análisis de citometría de flujo, como se describe en los Ejemplos.  
65

<Tinción inmunohistoquímica>

El anticuerpo que reconoce CAPRIN-1 puede ensayarse para determinar su reactividad con CAPRIN-1 mediante un método inmunohistoquímico bien conocido para los expertos en la materia usando una sección congelada fijada con paraformaldehído o acetona o una sección embebida en parafina fijada en paraformaldehído de un tejido obtenido de un paciente durante la operación quirúrgica o de un animal que lleva un tejido de xenoinjerto inoculado con una estirpe celular que expresa CAPRIN-1 ya sea de forma espontánea o después de la transfección.

Para la tinción inmunohistoquímica, el anticuerpo reactivo con CAPRIN-1 puede teñirse mediante diversos métodos. Por ejemplo, el anticuerpo puede visualizarse a través de la reacción con un anticuerpo anti-ratón de cabra, un anticuerpo anti-conejo de cabra o un anticuerpo anti-pollo de cabra conjugados con peroxidasa de rábano picante.

<Composición farmacéutica>

Una diana de la composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer de la presente invención no está particularmente limitada siempre que la diana sea un cáncer (células) que exprese un gen CAPRIN-1.

Los términos "tumor" y "cáncer" utilizados en el presente documento significan neoplasia maligna y se utilizan de manera intercambiable entre sí.

El cáncer diana en la presente invención es el cáncer que expresa un gen que codifica la proteína CAPRIN-1 y es, preferentemente, el cáncer de mama, el cáncer de riñón, el cáncer de páncreas, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el tumor cerebral, el cáncer de estómago, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de ovario, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga urinaria, el cáncer de esófago, la leucemia, el linfoma, el fibrosarcoma, el mastocitoma o el melanoma.

Los ejemplos específicos de estos tipos de cáncer incluyen, pero no limitan a, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama de tipo complejo, tumor mixto maligno de la glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas, cáncer de células grandes, glioma que es un tumor del tejido neuroepitelial, ependimoma, tumores neuronales, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de células de tipo pequeño a mediano, cáncer de ciego, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transversal, cáncer de colon sigmoide, cáncer rectal, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales, tumor de células del estroma, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático invasivo, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia intraductal papilar mucinoso, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, adenocarcinoma quístico seroso, tumor pseudopapilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (síndrome de Wermer), tumor de células de los islotes no funcionales, somatostatinooma y VIPoma.

Tanto el sujeto como el receptor son preferentemente mamíferos, por ejemplo, mamíferos incluyendo los primates, animales de compañía, ganado y animales de deporte, y son preferentemente en particular seres humanos, perros y gatos.

En caso de utilizar el anticuerpo de la presente invención como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica puede formularse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede utilizarse en forma de una inyección parenteral de una solución o suspensión aséptica con agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse con el anticuerpo mezclado en una forma de dosificación unitaria requerida para la práctica farmacéutica aceptada en general, en combinación apropiada con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, un emulsionante, un agente de suspensión, un detergente, un estabilizante, un agente aromatizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, etc. La cantidad del principio activo en una preparación de este tipo se determina de manera que pueda conseguirse una dosis apropiada dentro del intervalo prescrito.

Una composición aséptica para inyección pueden formularse de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional utilizando un vehículo tal como agua destilada inyectable.

Los ejemplos de soluciones acuosas para inyección incluyen solución salina fisiológica, soluciones isotónicas que contienen glucosa y otros adyuvantes, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio. Estas soluciones pueden usarse en combinación con un solubilizante apropiado, por ejemplo, un alcohol (específicamente, etanol) o un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol) o un detergente no iónico, por ejemplo, polisorbato 80 (TM) o HCO-60.

Los ejemplos de soluciones oleosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones pueden usarse en combinación con un agente solubilizante tal como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Las soluciones pueden

mezclarse además con un tampón (por ejemplo, una solución de tampón de fosfato y una solución de tampón de acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol) y un antioxidante. Las soluciones para inyección preparadas de este modo por lo general se cargan en ampollas adecuadas.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Los ejemplos específicos de sus formas de dosificación incluyen inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar y agentes de administración percutánea. Los ejemplos de inyecciones incluyen la inyección intravenosa, la inyección intramuscular, la inyección intraperitoneal y la inyección subcutánea, a través del cual la composición farmacéutica puede administrarse de forma sistémica o local.

15 Además, el método de administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad, el peso, el sexo, los síntomas, etc., de un paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o un polinucleótido que codifica el anticuerpo puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por ejemplo, de 0,0001 a 1000 mg/kg de peso corporal por dosis. Como alternativa, la dosis puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por ejemplo, de 0,001 a 100000 mg/kg de peso corporal de un paciente, aunque la dosis no se limita necesariamente a estos valores numéricos. Aunque la dosis y el método de administración varían dependiendo del peso, la edad, el sexo, los síntomas, etc., de un paciente, los expertos en la materia pueden seleccionar adecuadamente la dosis y el método.

20 La composición farmacéutica que incluye el anticuerpo, o fragmentos del mismo, de la presente invención puede administrarse a un sujeto para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente el cáncer de mama, el cáncer de riñón, el cáncer de páncreas, el cáncer de colon, el cáncer de pulmón, el tumor cerebral, el cáncer de estómago, el cáncer de cuello de útero, el cáncer de ovario, el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga urinaria, el cáncer de esófago, la leucemia, el linfoma, el fibrosarcoma, el mastocitoma o el melanoma.

30 La presente invención abarca adicionalmente medios para tratar y/o prevenir el cáncer, mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente o una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral a un sujeto. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, de la presente invención pueden administrarse simultáneamente con, o por separado, del agente antitumoral al sujeto. En el caso de la administración por separado de estas composiciones farmacéuticas, cualquiera de ellas puede administrarse primero o después. Sus intervalos de dosificación, dosis, vías de administración y el número de dosis pueden seleccionarse apropiadamente por un especialista. Las formas de dosificación de fármacos por separado que se administran al mismo tiempo también incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formuladas cada una mezclando el anticuerpo, o el fragmento del mismo, de la presente invención y el agente antitumoral en un vehículo (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores acerca de la prescripción, la formulación, las vías de administración, las dosis, el cáncer, etc., en cuanto a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que contienen el anticuerpo de la presente invención también son aplicables a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación descritas anteriormente que contienen el agente antitumoral.

45 Por tanto, la presente invención también proporciona una combinación farmacéutica como se define en las reivindicaciones, que comprende la composición farmacéutica de la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que comprende el anticuerpo, o el fragmento del mismo, de la presente invención y el agente antitumoral junto con un vehículo farmacológicamente aceptable.

50 <Polipéptido y ADN>

La presente invención proporciona adicionalmente los siguientes polipéptidos y ADN relacionados con el anticuerpo (a):

- 55 (i) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 8 y 12 y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NO: 13 y 14;
- (ii) un polipéptido de CDR de la cadena pesada seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y un ADN que codifica el polipéptido; y
- 60 (iii) un polipéptido de CDR de la cadena ligera seleccionado entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 y un ADN que codifica el polipéptido.

Estos polipéptidos y ADN pueden prepararse utilizando técnicas de recombinación génica tal como se ha descrito anteriormente.

65

## Ejemplos

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá específicamente con referencia a los Ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no tiene por objeto quedar limitado por estos ejemplos  
5 específicos.

### <Ejemplo 1: Análisis de la expresión del gen CAPRIN-1 en cada tejido>

La expresión del gen de CAPRIN-1 en tejidos normales caninos y humanos y diversas estirpes celulares humanas  
10 se examinó mediante RT-PCR de acuerdo con el Ejemplo 1(4) descrito en el documento WO2010/016526. Como resultado, se observó una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que se observó expresión en tejidos de cáncer de mama y de adenocarcinoma caninos. Como resultado de confirmar también la expresión en tejidos humanos, la expresión se confirmó solo en los testículos entre los tejidos normales, como con el gen CAPRIN-1 canino. Por el contrario, la expresión se detectó en muchos tipos de estirpes celulares de cáncer,  
15 incluyendo 8 estirpes celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1) y 4 estirpes celulares de cáncer de páncreas (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3), entre las células cancerosas. Estos resultados demostraron que CAPRIN-1 se expresa en diversas células cancerosas, aunque su expresión no se observa en tejidos normales distintos de los testículos.

### <Ejemplo 2: Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón contra CAPRIN-1>

Se mezclaron 100 µg de proteínas CAPRIN-1 humanas que tenían la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:  
2, que se prepararon en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526, con una cantidad igual de adyuvante MPL+TDM (Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se utilizó como una solución de antígeno por ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (Japan SLC,  
25 Inc.). Después, se realizaron 7 refuerzos cada 1 semana para completar la inmunización. Tres días después de la inyección final, el bazo de cada ratón se extirpó y se colocó entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Se repitieron procedimientos de lavado con PBS (-) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y se retiró el sobrenadante mediante centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos tres veces para obtener las células del bazo. Las células de  
30 bazo obtenidas se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas de ATCC) en una relación de 10:1. Se calentaron 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % a 37 °C y se mezclaron con 800 µl de PEG1500 (Boehringer Ingelheim GmbH) y la solución de PEG preparada de este modo se añadió a la mezcla de células, que después se dejó en reposo durante 5 minutos para la fusión celular. Después de la retirada del sobrenadante mediante centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un  
35 medio RPM11640 que contenía FBS al 15 % complementado con el equivalente 2 % de una solución de HAT (Life Technologies, Inc./Gibco) (medio selectivo HAT). Esta suspensión se inoculó a quince placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc) a una concentración de 100 µl/pocillo. Las células de bazo y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 % para obtener hibridomas.

Los hibridomas preparados se seleccionaron con la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los  
40 hibridomas contra proteínas CAPRIN-1 como índice. Se añadió solución un µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de albúmina de suero bovino (BSA) al 0,5 % (Sigma-Aldrich Corp.) a la  
45 misma a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, se añadió el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron a la mismos anticuerpos IgG (H+L) anti-ratón marcados con HRP (Invitrogen Corp.)  
50 diluidos 5000 veces con PBS, a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) a los mismos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo durante 15 a 30 minutos para provocar una reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se finalizó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm  
55 usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producían anticuerpos que tenían una alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se  
60 cultivaron en la placa. Una semana más tarde, se observaron hibridomas que formaban colonias individuales en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se seleccionaron con la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1 como índice. Se añadió solución un µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante  
65 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de BSA al 0,5 % a la misma a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, se añadió el sobrenadante



del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron a la mismos anticuerpos IgG (H+L) anti-ratón marcados con HRP (Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS, a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora.

5 Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) a los mismos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo durante 15 a 30 minutos para provocar una reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se finalizó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 112 líneas de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales reactivos con las proteínas CAPRIN-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales se exploraron para detectar anticuerpos reactivos con la superficie de células de cáncer de mama que expresaban CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron 10<sup>6</sup> células de una estirpe celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 15 100 µl de sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente al mismo y se dejaron reposar durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos anti-IgG de ratón de cabra marcados con FITC, (Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 0,1 % a los mismos y se dejaron reposar durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, la intensidad de fluorescencia se midió utilizando FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se realizó la misma operación que anteriormente utilizando el 20 suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas edad sin tratar diluido 500 veces con un medio de cultivo de hibridomas, en lugar de los anticuerpos, para preparar un control. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal (n.º 1) que tenía la intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control, es decir, era reactivo con la superficie de células de cáncer de mama.

### 25 <Ejemplo 3: Caracterización del anticuerpo monoclonal seleccionado>

Los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 2 se analizaron de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526 para determinar sus secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos codificadas en el mismo. Como resultado, el anticuerpo monoclonal n.º 1 estaba compuesto de una 30 región variable de la cadena pesada que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y una región variable de la cadena ligera que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12. La secuencia de nucleótidos resultante que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 se muestra en la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID 35 NO: 14 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 12.

Específicamente, se confirmó que el anticuerpo monoclonal n.º 1 consistía en la región variable de la cadena pesada que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena ligera que consistía en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12, en el que la región variable 40 de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 que consistían en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente y la cadena ligera de la región variable tenía CDR1, CDR2 y CDR3 que consistían en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, respectivamente.

### 45 <Ejemplo 4: Preparación del anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón>

Ambos extremos del fragmento de amplificación de genes que comprendía el nucleótido que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 obtenido en el Ejemplo 3, que consistía en una secuencia de nucleótidos representada por la SEC ID NO: 13, se trató con enzimas de restricción, después, se purificó y se insertó de acuerdo con un método habitual en un vector pcDNA4/myc-His (Invitrogen Corp.) que ya 50 tenía insertos de genes de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG<sub>1</sub> humana que comprendía la SEQ ID NO: 37. Además, el fragmento de amplificación génica que comprendía el gen de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 que consistía en una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 14 se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, después, se purificó y se insertó de acuerdo con un método habitual en un vector pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos de genes de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una 55 región constante de cadena L de IgG<sub>1</sub> humana que comprendía la SEQ ID NO: 38.

A continuación, el vector recombinante que tenía el inserto de la región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 13) del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 y el vector recombinante que tenía el inserto de la región variable de la 60 cadena ligera (SEQ ID NO: 14) del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 se introdujeron en células CHO-K1 (obtenidas de Riken Cell Bank). Específicamente, se cultivaron 2 × 10<sup>5</sup> células CHO-K1 en medio F12 de Ham (Invitrogen Corp.) que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos y se lavaron con PBS (-). Después, se añadió a las mismas un medio F12 de Ham recién preparado que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores lisados en 30 µl de OptiMEM (Invitrogen Corp.) 65 con 30 µl de reactivo de transfección Polyfect (Qiagen NV) y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 cotransfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 %,

complementado con 200 µg/ml de zeocina (Invitrogen Corp.) y 200 µg/ml de geneticina (Roche Diagnostics KK) y después se inocularon a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo para preparar una estirpe celular que producía de manera estable un anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón n.º 1 (n.º 1) que tenía las regiones variables del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1.

5 Cada estirpe celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150-cm<sup>2</sup> a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de cultivo que contenían el anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón n.º 1.

10 Además, se prepararon estirpes celulares que producían de manera estable anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos humanos-de ratón 1 a 11 de la misma manera que anteriormente, utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales derivados de ratón anti-CAPRIN-1 descritos en el documento WO2010/016526 como anticuerpos comparativos: un anticuerpo comparativo 1 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 16; un anticuerpo comparativo 2 que consistía en la  
15 región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 18; un anticuerpo comparativo 3 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 19 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 20; un anticuerpo comparativo 4 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 22; un anticuerpo comparativo 5 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 23 y la región  
20 variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 24; un anticuerpo comparativo 6 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 26; un anticuerpo comparativo 7 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 27 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 28; un anticuerpo comparativo 8 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 29 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 30; un anticuerpo comparativo 9 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 32; un anticuerpo comparativo 10 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 33 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 34; y un anticuerpo comparativo 11 que consistía en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 35 y la región variable de la cadena ligera de la SEC ID NO: 36. Cada estirpe celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150-cm<sup>2</sup> a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de cultivo que contienen cualquiera de los anticuerpos comparativos quiméricos humanos-de ratón 1 a 11.

35 <Ejemplo 5: Expresión de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas utilizando el anticuerpo anti-CAPRIN-1 n.º 1>

A continuación, las estirpes celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1), las estirpes celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN), la estirpe celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la estirpe celular de cáncer de ovario (SKOV3), las estirpes  
40 celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las estirpes celulares de cáncer de páncreas (Capan-2 y MIAPaCa-2), la estirpe celular de cáncer de próstata (PC3), la estirpe celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la estirpe celular de fibrosarcoma (HT1080), las estirpes celulares de tumor cerebral (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), las estirpes celulares de cáncer de estómago (MKN28 y MKN45), las estirpes celulares de cáncer de colon (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116), la estirpe celular de leucemia (LAM5) y la estirpe celular de linfoma (Ramos) que se confirmó que tenían la expresión génica de CAPRIN-1 se examinaron para determinar su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie celular utilizando los sobrenadantes de cultivo que contenían el n.º 1 obtenido en el  
45 Ejemplo 4. Se centrifugaron  $5 \times 10^5$  células de cada estirpe celular en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadió cada sobrenadante de cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo n.º 1 al tubo y se dejó reposar durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron al mismo anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón de cabra marcados con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, la intensidad de fluorescencia se midió utilizando FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo utilizado fueron las células que se hicieron reaccionar solamente con anticuerpos secundarios. Como resultado, las células complementadas con el anticuerpo n.º 1 tuvieron una intensidad de fluorescencia al menos un 35 % más fuerte que la del control negativo.  
50 Esto demostró que se expresan proteínas CAPRIN-1 en la superficie de la membrana celular de las estirpes celulares de cáncer humano. La anterior tasa de potenciación de la intensidad de fluorescencia se indicó mediante la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en cada estirpe celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

60 Tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia media (tasa de potenciación de la intensidad de fluorescencia) (%) =  $\frac{(\text{IFM de las células hechas reaccionar con los anticuerpos anti-CAPRIN-1}) - (\text{IFM control})}{(\text{IFM control})} \times 100$ .

65 <Ejemplo 6: Efecto antitumoral (actividad de ADCC) del anticuerpo anti-CAPRIN-1 en células cancerosas>

El anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón anti-CAPRIN-1 n.º 1 obtenido en el Ejemplo 4 se estudió para

determinar su capacidad para dañar las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 mediante un ensayo de actividad de ADCC. El sobrenadante del cultivo de las células que producían n.º 1 se purificó usando Hitrap Protein A Sepharose FF (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Después del reemplazo por PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se utilizó para el ensayo de actividad. Se recogieron 10<sup>6</sup> células de cada una de: la estirpe celular de cáncer de mama humano MCF7, la estirpe celular de cáncer de colon humano HCT-116, la estirpe celular de cáncer de páncreas humano MIAPaCa-2, la estirpe celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y la estirpe celular de cáncer de pulmón humano QG56 que se confirmó que tenían la expresión de CAPRIN-1, en un tubo de centrifuga de 50 ml, al que después se le añadieron 100 µCi de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % y se añadieron a una densidad de 2 × 10<sup>3</sup> células/pocillo a cada placa de 96 pocillos de fondo en V para preparar células diana. El anticuerpo n.º 1 purificado y los anticuerpos comparativos quiméricos humanos-de ratón 1 a 11 obtenidos en el Ejemplo 4 se añadieron cada uno a las mismas a una concentración de 1 µg/pocillo. Una población de células que contenía linfocitos NK humanos separada por medio de un método habitual a partir de linfocitos de sangre periférica humana, se añadió a la placa a una densidad de 2 × 10<sup>5</sup> células/pocillo y se cultivó a 37 °C durante 4 horas en condiciones de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberado de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 contra las células cancerosas. El control negativo utilizado fueron células complementadas con anticuerpos de control de isotipo. La población de células que contenía linfocitos NK que se usó en esta evaluación se preparó como se indica a continuación: se hicieron reaccionar células mononucleares de sangre periférica humana separadas de la sangre periférica humana de acuerdo con un método habitual utilizando una solución específica de separación por gravedad Histopaque para la separación de células mononucleares de sangre periférica humana (Sigma-Aldrich Corp.) con diversos anticuerpos marcados con FITC (el anticuerpo anti-CD3 humano, el anticuerpo anti-CD20 humano, el anticuerpos anti-CD 19 humano, el anticuerpo anti-CD11c humano y el anticuerpo anti-HLA-DR (Becton, Dickinson y y Company)) y se preparó una población de células sin teñir con los anticuerpos utilizando un clasificador de células (FACS Vantage sE (Becton y Dickinson and Company)) o un kit de separación de linfocitos NK humanos (Miltenyi Biotec KK). Como resultado de la evaluación de la actividad citotóxica contra las células cancerosas, los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos comparativos 1 a 11 utilizados tuvieron una actividad citotóxica de menos del 5 % contra todas las estirpes celulares. Por el contrario, el anticuerpo n.º 1 presentó una actividad citotóxica del 20 %, del 17 %, del 27 %, del 21 % y del 10 % frente a la estirpe celular de cáncer de mama humano MCF7, la estirpe celular de cáncer de colon humano HCT-116, la estirpe celular de cáncer de páncreas humano MIAPaCa-2, la estirpe celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y la estirpe celular de cáncer de pulmón humano QG56, respectivamente. Análogamente, los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos comparativos 1-11 utilizados tuvieron una actividad citotóxica de menos del 4 % contra todas las demás células cancerosas, las estirpes celulares de cáncer de mama ZR75-1, T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231V y MRK nu-1, las estirpes celulares de glioma T98G y U373, una estirpe celular de cáncer de pulmón A549, las estirpes celulares de cáncer de riñón Caki-1 y ACHN, una estirpe celular de cáncer de cuello uterino SW756, una estirpe celular de cáncer de vejiga urinaria T24, las estirpes celulares de cáncer de estómago MKN28 y MKN45, una estirpe celular de cáncer de colon SW480, una estirpe celular de leucemia LAM5 y una estirpe celular de linfoma Ramos. Por el contrario, se confirmó que el anticuerpo n.º 1 tenía una actividad citotóxica del 10 % o superior frente a estas estirpes celulares. Estos resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal obtenido n.º 1 contra CAPRIN-1 daña las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 a través de su actividad de ADCC y demostraron que el anticuerpo n.º 1 presenta una actividad citotóxica contra las células cancerosas humanas más fuerte que la de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Estos resultados acerca de la actividad citotóxica se obtuvieron mezclando el anticuerpo contra CAPRIN-1 utilizado en la presente invención, células linfocíticas (población que contenía linfocitos NK) y 2 × 10<sup>3</sup> células de cada estirpe celular de cáncer con cromo 51 incorporado, como se ha descrito anteriormente, seguido del cultivo de las células durante 4 horas, después del cultivo, la medición de la cantidad de cromo 51 liberada en el medio y el cálculo de la actividad citotóxica contra cada estirpe celular de cáncer de acuerdo con la siguiente expresión.

$$\text{Expresión: Actividad citotóxica (\%)} = \frac{\text{cantidad de cromo 51 liberado de las células diana complementadas con el anticuerpo contra CAPRIN-1 y células linfocíticas (población que contenía linfocitos NK)}}{\text{Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana complementadas con ácido clorhídrico}} \times 100.$$

A continuación, el anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón n.º 1 obtenido en el Ejemplo 4 se evaluó para determinar su efecto antitumoral en ratones portadores de cáncer *in vivo*. El anticuerpo utilizado se purificó por columna del sobrenadante de cultivo de cada estirpe celular que producía el anticuerpo n.º 1. De forma similar, los anticuerpos monoclonales quiméricos comparativos anti-CAPRIN-1 humanos-de ratón 1 a 11 preparados en el Ejemplo 4 también se evaluaron para determinar sus efectos antitumorales en ratones portadores de cáncer *in vivo*.

El anticuerpo n.º 1 se estudió para determinar su efecto antitumoral utilizando ratones portadores de cáncer en los que se trasplantó una estirpe celular de cáncer derivada de humanos que expresaba CAPRIN-1. Se trasplantaron 2 × 10<sup>6</sup> células de la estirpe celular de cáncer de páncreas humano Capan-2 (adquirido de ATCC) por ratón por vía subcutánea en los lomos de 65 ratones Balb/c desnudos (Japan SLC, Inc.) y se cultivaron hasta que el tamaño del tumor llegó a ser de aproximadamente 5 mm de diámetro. El anticuerpo n.º 1 y los anticuerpos quiméricos comparativos humanos-de ratón 1 a 11 se administraron cada uno por vía intraperitoneal a una dosis de 200 µg

(200 µl)/ratón a 5 (por anticuerpo) de estos ratones portadores de cáncer. Después, cada anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones portadores de cáncer a la misma dosis que anteriormente un total de tres veces durante 2 días. El tamaño del tumor se midió cada día y se observó el efecto antitumoral. Por otra parte, se administró PBS (-) en lugar de los anticuerpos a los 5 ratones portadores de cáncer restantes, que a su vez se utilizaron como grupo de control. El tamaño del tumor se calculó en términos de volumen de acuerdo a la expresión  $0,5 \times (\text{eje mayor} \times \text{eje menor} \times \text{eje menor})$ .

Como resultado de observar el efecto antitumoral, el tamaño del tumor se redujo a aproximadamente el 85 % en los ratones que recibieron los anticuerpos comparativos quiméricos humanos-de ratón 1 a 11, mientras que el anticuerpo n.º 1 presentó un efecto antitumoral de reducción del tamaño del tumor al 80 % en el grupo de ensayo que recibió el anticuerpo n.º 1 contra CAPRIN-1, el día 29 después de la administración de anticuerpos (definiéndose el tamaño del tumor en el grupo de control en la misma fecha como el 100 %). Estos resultados también demostraron que el anticuerpo n.º 1 ejerce un efecto antitumoral *in vivo* más fuerte que el de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

**<Ejemplo 7: Número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas reconocidas por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 n.º 1>**

Se examinaron estirpes celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1), estirpes celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN), una estirpe celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una estirpe celular de cáncer de ovario (SKOV3), estirpes celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), estirpes celulares de cáncer de páncreas (MIAPaCa-2 and Capan- 2), una estirpe celular de cáncer de próstata (PC3), una estirpe celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una estirpe celular de fibrosarcoma (HT1080), estirpes celulares de tumores cerebrales (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), estirpes celulares de cáncer de estómago (MNK28 y MNK45), estirpes celulares de cáncer de colon (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116), una estirpe celular de leucemia (LAM5) y una estirpe celular de linfoma (Ramos), utilizando un kit de ensayo QIFIKIT (Dako Japan Inc.) para determinar el número de moléculas de CAPRIN-1 en su superficie celular reconocidas por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 n.º 1. De forma similar, también se examinó el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de estas diversas células cancerosas utilizando los anticuerpos comparativos 1 a 11, que son anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-1 preparados en el Ejemplo 4.

De acuerdo con el protocolo adjunto al kit, el anticuerpo n.º 1 y los anticuerpos comparativos 1 a 11 se diluyeron a 5 µg/ml (en términos de concentración final) con PBS y esta dilución se añadió a cada estirpe celular y se hicieron reaccionar durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con fluorescencia adjuntos al kit como anticuerpos secundarios, junto con las perlas de calibración adjuntas al kit, a cada estirpe celular y se dejaron reposar durante 45 minutos en hielo. Cada estirpe celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. Después, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) para obtener un valor medio de intensidad de fluorescencia (media). Adicionalmente, los anticuerpos comparativos se miden de forma similar a la anterior para obtener una media. El control negativo utilizado fueron células que se habían hecho reaccionar con anticuerpos de control de isotipo y también se obtuvo una media. Cada valor medio de intensidad de fluorescencia (media) se utilizó para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas reconocidas por el anticuerpo n.º 1 fue de  $10^5$  o más por célula para todas las estirpes celulares de cáncer humano examinadas. Por otra parte, el número de moléculas reconocidas por los anticuerpos monoclonales comparativos 1 a 11 fue de menos de  $10^5$  por célula.

### Aplicabilidad industrial

El anticuerpo de la presente invención es útil en el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Composición de fármaco para el tratamiento y/o la prevención del cáncer

<130> PH-5302-PCT

<150> JP 2011-171379

<151> 04-08-2011

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

ES 2 609 859 T3

<211> 5562  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (190)..(2319)  
 <223>

10 <400> 1

```

cagagggctg ctggctggct aagtccctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg      60
ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc      120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgatttcag cggcctccgc      180
gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg      231
      Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
      1          5          10

tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg      279
Ser Gly Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala
15          20          25          30

gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc      327
Gly Ala Gly Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr
35          40          45

ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac      375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp
50          55          60

aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac      423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr
65          70          75

cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat      471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp
80          85          90

gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa      519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys
95          100          105          110

gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca      567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr
115          120          125
  
```

ES 2 609 859 T3

ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa	615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu	
130 135 140	
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa	663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys	
145 150 155	
ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga	711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly	
160 165 170	
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat	759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr	
175 180 185 190	
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag	807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln	
195 200 205	
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa	855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu	
210 215 220	
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag	903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu	
225 230 235	
cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat	951
Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn	
240 245 250	
ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac	999
Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp	
255 260 265 270	
cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa	1047
Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln	
275 280 285	
agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa	1095
Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu	
290 295 300	
aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt	1143
Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val	
305 310 315	
gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca	1191
Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala	
320 325 330	
tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca	1239
Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala	
335 340 345 350	
gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg	1287
Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met	
355 360 365	
cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat	1335
Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn	

## ES 2 609 859 T3

370	375	380	
cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca			1383
Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr			
385	390	395	
caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa			1431
Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu			
400	405	410	
tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca			1479
Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr			
415	420	425	430
cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa			1527
Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln			
435	440	445	
ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa			1575
Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu			
450	455	460	
cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act			1623
Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr			
465	470	475	
aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag			1671
Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln			
480	485	490	
gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca			1719
Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala			
495	500	505	510
gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt			1767
Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val			
515	520	525	
cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag			1815
Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln			
530	535	540	
gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa			1863
Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln			
545	550	555	
aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat			1911
Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His			
560	565	570	
ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct			1959
Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro			
575	580	585	590
cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat			2007
Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn			
595	600	605	
agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg			2055
Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met			
610	615	620	
aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt			2103

ES 2 609 859 T3

Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly	
625	630
635	
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser	
640	645
650	
cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat	2199
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr	
655	660
665	670
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala	
675	680
685	
cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa	2295
Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln	
690	695
700	
atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca	2349
Met Asn Thr Gln Gln Val Asn	
705	
aaaacacact ggccagtgtt ccataatag ttaccagaag agttattatc tatttgttct	2409
ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat	2469
tgtcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactatct ttactctgca tgttctgtcc	2529
taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctcagattcc tcacccttgc ttaggagtaa	2589
aacaatatac tttacagggt gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag	2649
gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctcga gttattcaat	2709
gataactgac aaactaaatt atttccttag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtggtt	2769
tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acgttcagat	2829
gcataccaaa ttatgcatgg gtccctaatca cacatataag gctggctacc agctttgaca	2889
cagcactggt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac	2949
agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaattag gctttgattg gcactttttg	3009
aaaaatatgc acaaatatg ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa	3069
tatttagata cttttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat	3129
tggtactatc tatcattcct tatgacatgt acattgtctg tcactaatcc ttggattttg	3189
ctgtattgtc acctaaattg gtacaggtac tgatgaaaat ctctagtgga taatcataac	3249
actctcggtc acatgttttt ccttcagctt gaaagctttt ttttaaagg aaaagatacc	3309
aatgcctgc tgctaccacc cttttcaatt gctatctttt gaaaggcacc agtatgtgtt	3369
ttagattgat ttccctgttt cagggaaatc acggacagta gtttcagttc tgatggtata	3429
agcaaaacaa ataaaacgtt tataaaagtt gtatcttgaa aactggtgt tcaacagcta	3489
gcagcttatg tgattcacc catgccacgt tagtgtcaca aattttatgg tttatctcca	3549



ES 2 609 859 T3

gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609  
ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataatc cttcccttag atgcataggg 3669  
agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729  
ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789  
tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849  
taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattctt 3909  
ccagtaggtg ctcagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969  
tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctgttgaac attccacatt 4029  
caaaagtttt gtaggggtgt gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089  
aaaataagtt cttgactttt ctcagtgtgt gttgtggtac atcatattgg aagggttaac 4149  
ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgctg ctttaaatga 4209  
catctgcctg ggatgtacca caaccatag ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat 4269  
atgtgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329  
atgtgctatc tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc 4389  
ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449  
gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaagggtt tcatagtttg 4509  
actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaaactat aatttttctt 4569  
tttttggtta ttttaccatc acagttttaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629  
tattttttaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689  
ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749  
ccttttgttt ggtcaaatgc atattttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809  
tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869  
taaactcatc catgtggata tgaaacttct tttttaaacc ttaaaaagggt agaatgttat 4929  
tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989  
aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049  
atcagttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109  
tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaaggttcat taactgaggt 5169  
gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttccctaagt ttttaggaca tttgttcatt 5229  
atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaacct 5289  
tcattttatg ttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa 5349  
attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgccttgat cttgtccttt 5409  
ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaaoga aagtaaattg ttaaggctca 5469  
tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatgtt 5529  
taaaattaca ctgattaaa taatatgaaa gtc 5562

ES 2 609 859 T3

<210> 2  
 <211> 709  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

```

Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser Ser Gly
1          5          10          15

Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala
20          25          30

Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr Gly Ala
35          40          45

Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp Lys Lys
50          55          60

Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr Gln Glu
65          70          75          80

Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp Ala Val
85          90          95

Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys Glu Leu
100         105         110

Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr Ile Lys
115         120         125

Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu Gln Lys
130         135         140

Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys Leu Gly
145         150         155         160

Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly Val Pro
165         170         175

Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Lys Leu
180         185         190

Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln Tyr Glu
195         200         205
    
```

ES 2 609 859 T3

His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu Lys Pro  
 210 215 220  
 Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu Arg Val  
 225 230 235 240  
 Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn Gly Leu  
 245 250 255  
 Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp Gln Val  
 260 265 270  
 Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln Ser Glu  
 275 280 285  
 Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu Thr Gln  
 290 295 300  
 Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val Glu Thr  
 305 310 315 320  
 Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala Ser Pro  
 325 330 335  
 Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala Asp Pro  
 340 345 350  
 Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met Gln Gly  
 355 360 365  
 Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn Gln Thr  
 370 375 380  
 Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr Gln Asn  
 385 390 395 400  
 Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu Ser Arg  
 405 410 415  
 Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr Gln Val  
 420 425 430  
 Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln Pro Leu  
 435 440 445  
 Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu Pro Ile



ES 2 609 859 T3

<211> 3553  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (190)..(2274)  
 <223>

10 <400> 3

```

cagagggctg ctggctggct aagtccctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg      60
ctctcggtgc agcgggacag ggogaagcgg cctgcgcccc cggagcgcgc gacactgccc      120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgatttcag cggcctccgc      180
gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg      231
      Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
      1          5          10

tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg      279
Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala
15          20          25          30

gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc      327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr
          35          40          45

ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac      375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp
          50          55          60

aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac      423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr
          65          70          75

cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat      471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp
          80          85          90

gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa      519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys
95          100          105          110

gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca      567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr
          115          120          125

ata aag aag aca gca cgt ccg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa      615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu
          130          135          140

cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa      663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys
          145          150          155

ttg gga gat gat gaa gtg ccg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga      711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly
    
```

ES 2 609 859 T3

160		165		170		
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat						759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr						
175		180		185		190
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag						807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln						
		195		200		205
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa						855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu						
		210		215		220
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag						903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu						
		225		230		235
cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat						951
Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn						
		240		245		250
ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac						999
Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp						
255		260		265		270
cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa						1047
Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln						
		275		280		285
agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa						1095
Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu						
		290		295		300
aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt						1143
Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val						
		305		310		315
gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca						1191
Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala						
		320		325		330
tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca						1239
Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala						
335		340		345		350
gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg						1287
Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met						
		355		360		365
cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat						1335
Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn						
		370		375		380
cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca						1383
Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr						
		385		390		395
caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa						1431
Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu						
		400		405		410
tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca						1479

ES 2 609 859 T3

Ser	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro	Asn	Gln	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr		
415					420					425					430		
cag	ggt	cct	ttg	gta	tca	tcc	aca	agt	gag	ggg	tac	aca	gca	tct	caa		1527
Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ser	Gln		
				435					440					445			
ccc	ttg	tac	cag	cct	tct	cat	gct	aca	gag	caa	cga	cca	cag	aag	gaa		1575
Pro	Leu	Tyr	Gln	Pro	Ser	His	Ala	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu		
			450					455						460			
cca	att	gat	cag	att	cag	gca	aca	atc	tct	tta	aat	aca	gac	cag	act		1623
Pro	Ile	Asp	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Thr		
		465					470						475				
aca	gca	tca	tca	tcc	ctt	cct	gct	gcg	tct	cag	cct	caa	gta	ttt	cag		1671
Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Val	Phe	Gln		
	480					485					490						
gct	ggg	aca	agc	aaa	cct	tta	cat	agc	agt	gga	atc	aat	gta	aat	gca		1719
Ala	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Asn	Ala		
495				500						505				510			
gct	cca	ttc	caa	tcc	atg	caa	acg	gtg	ttc	aat	atg	aat	gcc	cca	ggt		1767
Ala	Pro	Phe	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Pro	Val		
				515					520					525			
cct	cct	ggt	aat	gaa	cca	gaa	act	tta	aaa	cag	caa	aat	cag	tac	cag		1815
Pro	Pro	Val	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gln		
			530					535						540			
gcc	agt	tat	aac	cag	agc	ttt	tct	agt	cag	cct	cac	caa	gta	gaa	caa		1863
Ala	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	His	Gln	Val	Glu	Gln		
		545				550						555					
aca	gag	ctt	cag	caa	gaa	cag	ctt	caa	aca	gtg	ggt	ggc	act	tac	cat		1911
Thr	Glu	Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His		
	560					565						570					
ggt	tcc	cca	gac	cag	tcc	cat	caa	gtg	act	ggt	aac	cac	cag	cag	cct		1959
Gly	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	His	Gln	Val	Thr	Gly	Asn	His	Gln	Gln	Pro		
575					580					585					590		
cct	cag	cag	aac	act	gga	ttt	cca	cgt	agc	aat	cag	ccc	tat	tac	aat		2007
Pro	Gln	Gln	Asn	Thr	Gly	Phe	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Asn		
				595					600					605			
agt	cgt	ggt	gtg	tct	cgt	gga	ggc	tcc	cgt	ggt	gct	aga	ggc	ttg	atg		2055
Ser	Arg	Gly	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Met		
			610					615						620			
aat	gga	tac	cgg	ggc	cct	gcc	aat	gga	ttc	aga	gga	gga	tat	gat	ggt		2103
Asn	Gly	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly		
		625					630						635				
tac	cgc	cct	tca	ttc	tct	aac	act	cca	aac	agt	ggt	tat	aca	cag	tct		2151
Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ser		
	640					645						650					
cag	ttc	agt	gct	ccc	cgg	gat	tac	tct	ggc	tat	caa	cgg	gat	gga	tat		2199
Gln	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Arg	Asp	Gly	Tyr		
655					660					665					670		

ES 2 609 859 T3

```

cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc      2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala
              675                    680                    685

cca cga ggt aat att ttg tgg tgg tga tcctagctcc taagtggagc      2294
Pro Arg Gly Asn Ile Leu Trp Trp
              690

ttctgttctg gccttggag agctgttaat agtctgcatg ttaggaatac atttatcctt      2354

tccagacttg ttgctagga ttaaatgaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttggacc      2414

caaattttaa tttttgaatg atttaatttt cctgttact atataaactg tcttgaaaac      2474

tagaacatat totcttctca gaaaaagtgt tttccaact gaaaattatt tttcaggtcc      2534

taaacctgc taaatgtttt taggaagtac ttactgaaac atttttgtaa gacatttttg      2594

gaatgagatt gaacatttat ataaatttat tattcctctt tcattttttt gaaacatgcc      2654

tattatattt tagggccaga caccctttaa tggccggata agccatagtt aacatttaga      2714

gaaccattta gaagtgatag aactaatgga atttgcaatg ccttttgac ctctattagt      2774

gatataaata tcaagttatt totgactttt aaacaaaact cccaaattcc taacttattg      2834

agctatactt aaaaaaatt acaggtttag agagtttttt gtttttcttt tactgttggg      2894

aaactacttc ccattttggc aggaagttaa cctatttaac aattagagct agcatttcat      2954

gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgagggagg ttaaacaatca aacaggtttc      3014

ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgttaaggag gaattacaac gtactttgat      3074

ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaaaaat taatggatca      3134

cttgggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta      3194

tgttctttcc caccttgtag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc      3254

tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat      3314

gttatgtagt ttctttttta cagtttaggt aataaggctt gttttcattc tgggtgctttt      3374

attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga      3434

atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgetgtatct attcccaacg      3494

cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa ttttgttga atgaatgaa      3553

```

<210> 4  
 <211> 694  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

```

Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser Ser Gly
1          5          10          15

```

```

Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala

```

5

10





ES 2 609 859 T3

Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln Ser Glu  
 275 280 285

Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu Thr Gln  
 290 295 300

Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val Glu Thr  
 305 310 315 320

Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala Ser Pro  
 325 330 335

Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala Asp Pro  
 340 345 350

Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met Gln Gly  
 355 360 365

Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn Gln Thr  
 370 375 380

Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr Gln Asn  
 385 390 395 400

Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu Ser Arg  
 405 410 415

Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr Gln Val  
 420 425 430

Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln Pro Leu  
 435 440 445

Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu Pro Ile  
 450 455 460

Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala  
 465 470 475 480

Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln Ala Gly  
 485 490 495

Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala Ala Pro  
 500 505 510

Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro  
 515 520 525

ES 2 609 859 T3

Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln Ala Ser  
 530 535 540

Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln Thr Glu  
 545 550 555 560

Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His Gly Ser  
 565 570 575

Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro Pro Gln  
 580 585 590

Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn Ser Arg  
 595 600 605

Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met Asn Gly  
 610 615 620

Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Arg  
 625 630 635 640

Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Gln Phe  
 645 650 655

Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr Gln Gln  
 660 665 670

Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala Pro Arg  
 675 680 685

Gly Asn Ile Leu Trp Trp  
 690

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

<400> 5

Ala Tyr Tyr Met His  
 10 1 5

<210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 6

ES 2 609 859 T3

Arg Val Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Gly

5 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 7

Arg Ile Tyr Tyr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly  
 1 5 10

10 <210> 8  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 8

Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys  
 1 5 10 15

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ala Tyr Tyr Met His Trp Val Lys Gln  
 20 25 30

Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Asn Asn  
 35 40 45

Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr  
 50 55 60

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

Phe Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Ile Tyr Tyr Gly  
 85 90 95

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 100 105 110

20 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 9

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn  
 1 5 10 15

ES 2 609 859 T3

<210> 10  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5  
 <400> 10

Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

10  
 <210> 11  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15  
 <400> 11

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr  
 1 5

20  
 <210> 12  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25  
 <400> 12

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

Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr  
 20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser  
 35 40 45

Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala  
 65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly  
 85 90 95

Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln  
 100

30  
 <210> 13  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 13

ES 2 609 859 T3

ggacctgacc tggatgaagcc tggggcttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctgggtac 60  
 tcattcaactg cctactacat gcactgggtg aagcagagcc atggaaagag cottgagtgg 120  
 attggacgtg ttaatcctaa caatggtggt actacctaca accagaagtt caagggcaag 180  
 gccatattaa ctgtagataa gtcattccagc acagcctaca tggagctccg cagcctgaca 240  
 tttagaggact ctgctggtcta ttactgtgca agaaggattt actacggcta ctttgactac 300  
 tggggccaag ggaccacggt caccgtctcc tca 333

<210> 14  
 <211> 312  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 14

gcattctttg ctgtgtctct agggcagagg gccaccatct cctgcaaggc cagccaaagt 60  
 gttgattatg atggtgatag ttatatgaac tggtagcaac agaaaccagg acagccaccc 120  
 aaactcctca tctatgttgc atccaatctt gaatctgggg tcccagccag gttcagtggc 180  
 agtgggtctg ggacagactt caccctcaac atccatcctg tggaggagga ggatgctgca 240  
 acctattact gtcagcaaag taatgaggat ccgtacacgt tccgaggagg taccaagcta 300  
 gagatcaaac aa 312

10

<210> 15  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 15

ES 2 609 859 T3

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

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

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

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Ala Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro  
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr  
 145

5

<210> 16  
 <211> 139  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 16

ES 2 609 859 T3

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr  
 1 5 10 15

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

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn  
 35 40 45

Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro  
 50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser  
 65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn  
 85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp  
 100 105 110

Ser Thr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala  
 115 120 125

Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Asn Pro Tyr Asp  
 130 135

<210> 17  
 <211> 148  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 17



ES 2 609 859 T3

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

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

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

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Ala Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro  
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr  
 145

<210> 18  
 <211> 132  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 18

Ala Val Leu Arg Cys Ser Arg Gly Leu Leu Val Ile Trp Ile Ser Asp  
 1 5 10 15

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

Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Val  
 35 40 45

10

ES 2 609 859 T3

Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Gln Pro  
 50 55 60

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser Trp Val Pro  
 65 70 75 80

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 85 90 95

Ser Asn Val His Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn  
 100 105 110

His Gly Ser Phe Leu Pro Ser Arg Ser Glu Gln Val Pro Ser Trp Arg  
 115 120 125

Ser Asn Asn Arg  
 130

<210> 19  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 19

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

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

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

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Ala Tyr  
 115 120 125

10

ES 2 609 859 T3

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro  
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr  
 145

5 <210> 20  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 20

Arg Thr Thr Ser His Met Asp Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro  
 1 5 10 15

Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg  
 20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln  
 35 40 45

Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp  
 50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser  
 65 70 75 80

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Gln His Phe Trp Ser Thr Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 100 105 110

Ile Lys Gln Ser Asp  
 115

10 <210> 21  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 21

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

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

ES 2 609 859 T3

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

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Ala Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro  
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr  
 145

<210> 22  
 <211> 94  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 22

Ser Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
 1 5 10 15

Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu  
 20 25 30

Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe  
 35 40 45

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val  
 50 55 60

Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp  
 65 70 75 80

Pro Tyr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln  
 85 90

10

ES 2 609 859 T3

<210> 23  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 23

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

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

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

Thr Asp Tyr Asn Met Asp Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu  
 50 55 60

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

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

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

Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Arg Ser Tyr Asp Tyr Glu Gly Phe Ala Tyr  
 115 120 125

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Pro  
 130 135 140

Pro Ser Val Tyr  
 145

10 <210> 24  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 24

ES 2 609 859 T3

Gly Leu Phe Cys Ser Val Glu Arg Cys His Tyr Gln Leu Gln Ser Ser  
 1 5 10 15

Gln Asn Leu Leu Ser Ile Val Asn Arg Tyr His Tyr Met Ser Gly Asn  
 20 25 30

Pro Pro Lys Leu Leu Val Tyr Pro Ala Leu Leu Ile Tyr Glu Ala Ser  
 35 40 45

Ile Thr Lys Ser Cys Val Pro Asp Arg Phe Thr Arg Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Thr Asn Phe Thr Leu Thr Ile Asn Phe Val His Ala Asp Asp Leu Ile  
 65 70 75 80

Phe Tyr Tyr Cys Gln His Asn Arg Gly Ser Phe Leu Pro Ser Ser Ser  
 85 90 95

Val Gln Val Pro Arg Arg Arg Ser Asn  
 100 105

- <210> 25
- <211> 100
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 25

ES 2 609 859 T3

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

5

<210> 26  
 <211> 90  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 26

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

10

<210> 27  
 <211> 116  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15

ES 2 609 859 T3

<400> 27

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

Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln  
 20 25 30

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile  
 35 40 45

Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys Gly Lys  
 50 55 60

Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu  
 65 70 75 80

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

Glu Tyr Gly Asn Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr  
 100 105 110

Val Ser Ser Asn  
 115

5 <210> 28  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 28



ES 2 609 859 T3

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

<210> 29  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 29

5

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

10

ES 2 609 859 T3

<210> 30  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 30

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

10 <210> 31  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 31

Pro Arg Ala Ser Leu Gly Val Ser Glu Thr Leu Leu Cys Thr Ser Gly  
 1 5 10 15  
 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly  
 20 25 30  
 Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr  
 35 40 45  
 Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg  
 50 55 60

ES 2 609 859 T3

Asp Asn Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala  
65 70 75 80

Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asn Trp Ala Phe Asp  
85 90 95

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Lys  
100 105

<210> 32  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

5

<400> 32

Ser Gly Asp Arg Val Ser Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser  
1 5 10 15

Asn Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser His Glu Ser Pro Arg Leu  
20 25 30

Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe  
35 40 45

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val  
50 55 60

Glu Thr Glu Asp Phe Gly Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Asn Ser Trp  
65 70 75 80

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gln  
85 90

10

<210> 33  
<211> 111  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

15

<400> 33

ES 2 609 859 T3

Pro Ala Cys Leu Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser  
 1 5 10 15

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro  
 20 25 30

Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly  
 35 40 45

Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
 50 55 60

Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg  
 65 70 75 80

Ala Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Pro Leu Leu Tyr  
 85 90 95

Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser  
 100 105 110

<210> 34  
 <211> 102  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 34

5

ES 2 609 859 T3

Arg Leu Pro Phe Tyr Ser Leu Glu Gln Arg Ala Thr Ile Ser Tyr Arg  
 1 5 10 15

Ala Ser Lys Asn Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn  
 20 25 30

Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser  
 35 40 45

Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly  
 50 55 60

Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala  
 65 70 75 80

Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Leu Val  
 85 90 95

Pro Ser Trp Lys Ser Asn  
 100

<210> 35  
 <211> 101  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 35

Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met His  
 1 5 10 15

Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile  
 20 25 30

Asp Pro Ser Asn Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys  
 35 40 45

Ala Thr Leu Asn Val Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu  
 50 55 60

Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly  
 65 70 75 80

Leu Arg His Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val  
 85 90 95

Thr Val Ser Ser Lys  
 100

10

ES 2 609 859 T3

<210> 36  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 36

Thr Ile Leu Trp Arg Glu Gly Pro Phe Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro  
 20 25 30

Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser  
 35 40 45

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr  
 50 55 60

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 65 70 75 80

Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser Glu Glu Val Pro Ser Trp Arg  
 85 90 95

Ser Asn Lys

10 <210> 37  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 37

ES 2 609 859 T3

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

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

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

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

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
85 90 95

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

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
115 120 125

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

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

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

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
210 215 220

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

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
245 250 255

ES 2 609 859 T3

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270

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

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

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

<210> 38  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

10



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tienen reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1, el anticuerpo o el fragmento del mismo que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y una región variable de la cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multispecifico.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, para su uso en un método para tratar y/o prevenir el cáncer.
- 25 5. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
- 30 6. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo.
- 35 7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en un método para tratar y/o prevenir el cáncer.
- 40 8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
- 45 9. Una combinación farmacéutica, que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
10. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en un método para tratar y/o prevenir el cáncer.
11. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
12. Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.