

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 841**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)	G01N 33/15	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)	G01N 33/50	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)	G01N 33/574	(2006.01)
A61P 35/04	(2006.01)		
C07K 16/28	(2006.01)		
C12N 1/15	(2006.01)		
C12N 1/19	(2006.01)		
C12N 1/21	(2006.01)		
C12N 5/10	(2006.01)		
C12P 21/08	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2009 PCT/JP2009/062901**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2010 WO2010008051**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2009 E 09797975 (1)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.12.2016 EP 2322610**

54 Título: **Anticuerpo anti-CLCP1 humano y uso del mismo**

30 Prioridad:

16.07.2008 JP 2008185305

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

26.05.2017

73 Titular/es:

**MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES
CO., LTD. (50.0%)**

5-3, Sakae 4-chome Naka-ku Nagoya-shi

Aichi 460-0008, JP y

ONCOMICS CO., LTD. (50.0%)

72 Inventor/es:

**ONO, KEN-ICHIRO y
TAKAHASHI, TAKASHI**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 613 841 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-CLCP1 humano y uso del mismo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a anticuerpos frente al dominio extracelular de CUB humano, homología de LCCL, proteína 1 de dominios de homología de VNIII de factor de coagulación (CLCP1) y usos de los mismos.

10 **Antecedentes de la técnica**

La molécula de CLCP1 también se denomina molécula similar a neuropilina obtenida a partir de células endoteliales y del músculo liso (ESDN) o discoidina, dominio de CUB y LCCL que contiene 2 (DCBLD2), que es una proteína de membrana de tipo I de 775 aminoácidos con una sola región transmembrana.

15 Se ha informado de una isoforma de 743 aminoácidos, que es una variante de corte y empalme, y tiene un dominio funcional extracelular sustancialmente idéntico. En 1999, Nadadur S. *et al.* aislaron un fragmento genético (Documento de No Patente 1), y la información sobre la mayor parte de la secuencia de aminoácidos de CLCP1 (posiciones de 106 a 775 en la SEQ ID NO: 2) se ha desvelado en la Publicación N.º (JP-A) 2002-523076 de Kohyo de la Solicitud de Patente Japonesa (publicación en fase nacional japonesa sin examinar que corresponde a una publicación internacional no japonesa). El dominio extracelular tiene como motivos, el dominio CUB, el dominio LCCL, y el dominio FA58C del extremo N-terminal. Posteriormente, se ha informado que CLCP1 se expresa en los músculos lisos vasculares de arterias y la túnica media de las arterias carótidas después de lesión con globo, así como en células de arterias coronarias y músculos lisos, y que CLCP1 es útil en el campo cardiovascular tal como para el tratamiento de reestenosis después de PTCA o arteriosclerosis (Documento de Patente 1).

25 Por otro lado, Takahashi *et al.* (los presentes inventores) revelaron que la molécula de CLCP1 está altamente expresada en células de sublíneas de cáncer de pulmón metastásico se expresa a una tasa elevada *in vivo* en cánceres de pulmón. Además, Takahashi *et al.* identificaron que el crecimiento y la metástasis del cáncer se inhibía mediante la expresión de forma constitutiva de los ARN horquillado corto (ARNhc) frente a CLCP1, que biosintetiza los ARN de interferencia pequeños (ARNsi) dentro de las células (véase, por ejemplo, Documentos de No Patente 1 a 4).

35 Se demostró que los efectos que se han descrito anteriormente se producían mediante la inhibición de la expresión de CLCP1 a través de expresión constitutiva de los ARNhc que biosintetizan los ARNsi dentro de las células. La homología entre las moléculas de CLCP1 de ratón y de ser humano es de aproximadamente un 85 % a nivel del aminoácido. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales que se unen de forma específica a la molécula siguen sin estar disponibles en el mercado. Apenas existen documentos científicos que informen de tales anticuerpos monoclonales. Por lo tanto, tales anticuerpos aún se entienden poco en términos de su actividad, función, y similares. Además, la utilidad de los anticuerpos debe esperar estudios prospectivos.

40 El documento WO 2006/138275 A2 desvela que los dominios de CUB y discoidina presentes en DCBLD2 se han relacionado con la regulación de la agregación y migración celular. Para dirigirse a células madre cancerosas con un aumento de la expresión de DCBLD2, se producen anticuerpos monoclonales frente al dominio extracelular de DCBLD2. El documento WO 2006/138275 A2 también desvela que los anticuerpos anti-DCBLD2 se usan como agentes terapéuticos en un modelo de xenoinjerto de ratón. Además, se describen fragmentos de anticuerpo, conjugados de anticuerpo y anticuerpos humanizados. El documento WO 2006/138275 A2 no tiene divulgación de un anticuerpo que reconozca de forma específica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2 que sea capaz de inhibir la invasión y migración celular, y suprimir el crecimiento y metástasis de células cancerosas, y tiene una citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo.

50 El documento JP 2003 189872 A desvela anticuerpos policlonales frente a péptidos obtenidos a partir de ESDN humano (dominio de CUB) y dominio de FV/VIII, FA58C. Dichos anticuerpos se usan para detectar ESDN en transferencias de Western. Además, el documento JP 2003 189872 A describe anticuerpos monoclonales o policlonales frente a ESDN humano o fragmento del mismo, una composición farmacéutica que contiene dicho anticuerpo y un método inmunológico para medir una cantidad de ESDN humano usando dicho anticuerpo.

SADEGHI, M.M. *ET AL.* desvela un anticuerpo anti-ESDN humano. Además, SADEGHI, M.M. *ET AL.* describe estudios de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia que usan dicho anticuerpo.

60 KOSHIKAWA, K. *ET AL.* desvela la regulación positiva de CLCP1 en células de cáncer de pulmón altamente metastásicas.

65 KOBUE K *ET AL.* desvela la producción de anticuerpo anti-ESDN y análisis transferencia de Western. Dichos anticuerpos policlonales se generan frente a péptidos obtenidos a partir de CUB y obtenidos a partir de FA58. Dichos anticuerpos policlonales se usan para tinción inmunohistoquímica de ESDN en vasos de rata lesionados con globo.

[Documentos de la Técnica Anterior]

[Documentos de Patente]

- 5 [Documento de Patente 1] Solicitud de Patente Japonesa N.º 2001-397725
 [Documento de Patente 2] WO 2006/138275 A2
 [Documento de Patente 3] JP 2003 189872 A

[Documentos de No Patente]

- 10 [Documento de No Patente 1] Biochim Biophys Acta. (1999) 23 de Dic; 1489 (2-3): 433-439.
 [Documento de No Patente 2] Katsumi Koshikawa, *et al.*, Journal of Japan Surgical Society, Vol. 104, N.1 Supl. (20030430) p. 520, " Isolation and analysis of novel metastasis-related gene CLCP1 in human lung cancer".
 15 [Documento de No Patente 3] Koshikawa K, *et al.*, Oncogene (2002) 21: 2822-2828, "Significant up-regulation of a novel gene, CLCP1, in a highly metastatic lung cancer subline as well as in lung cancers *in vivo*".
 [Documento de No Patente 4] Nagai H, *et al.*, Oncogene (2007) 26: 4025-4031, "CLCP1 interacts with semaphorin 4B and regulates motility of lung cancer cells".
 [Documento de No Patente 5] SADEGHI, M.M. *ET AL.*: " is a marker of vascular remodeling and regulator of cell proliferation in graft arteriosclerosis", AMERICAN JOURNAL OF TRANSPLANTATION, vol. 7, 2007, páginas 20
 20 2098-2105, XP008135570.
 [Documento de No Patente 6] KOBUE K *ET AL.*: "ESDN, a novel neuropilin-like membrane protein cloned from vascular cells with the longest secretory signal sequence among eukaryotes, is up-regulated after vascular injury", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 276, n.º 36, 7 de septiembre de 2001 (07-09-2001), páginas 34105-34114, XP002265293.

25

Divulgación de invención

[Problemas a resolver por la invención]

- 30 En las circunstancias que se han descrito anteriormente, un objetivo de la presente invención es proporcionar anticuerpos que tengan actividad biológica útil tal como la actividad de inhibir la metástasis, invasión, migración, o crecimiento celular de cáncer de zonas de pulmón, o citotoxicidad, y cursos de los mismos. En detalle, el objetivo de la presente invención es proporcionar:
- 35 nuevos anticuerpos que reconozcan un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano; ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos; vectores que por que en los ácidos nucleicos de una manera expresable; células transformadas que porten los vectores; métodos para producir los anticuerpos; métodos de diagnóstico para cáncer y pronóstico de cáncer usando los anticuerpos; métodos inmunológicos para medir células o tejidos; kits para detectar los niveles de expresión de CLCP1 en células o tejidos; composiciones farmacéuticas que comprendan los anticuerpos; agentes farmacéuticos para su uso en el tratamiento o prevención de cánceres que expresan CLCP1; agentes para inhibir el crecimiento, migración, invasión, o metástasis de células cancerosas que expresan CLCP1; agentes citotóxicos y agentes para inmunotinción; y agentes farmacéuticos para su uso en el tratamiento o prevención de agentes tumorales que expresan CLCP1. Otro objetivo de la presente invención es proporcionar métodos de cribado de sustancias candidatas que inhiben el crecimiento, in migración, invasión, 45 o metástasis de células cancerosas, o sustancias candidatas que tengan citotoxicidad frente a células cancerosas.

[Medios para Resolver los Problemas]

- 50 Los presentes inventores estudiaron cómo conseguir los objetivos que se han descrito anteriormente mediante dirección de CLCP1 humano. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la eficacia de la inmunización aumentaba de forma específica usando fragmentos parciales del dominio extracelular de CLCP1 humano. Por lo tanto, los presentes inventores obtuvieron de forma satisfactoria anticuerpos monoclonales de anti-CLCP1 humano que reconocen de forma específica el dominio extracelular de CLCP1 humano, identificaron 55 secuencias y epítomos de anticuerpos preferentes.

- Además, los presentes inventores condujeron diversos experimentos usando los anticuerpos y descubrieron que los anticuerpos tienen el efecto de suprimir la metástasis de células de cáncer de pulmón. De forma específica, los presentes inventores revelaron que los anticuerpos tienen una o más las cinco actividades frente a células de cáncer de pulmón que se describen a continuación y confirmaron la utilidad de los anticuerpos:
- 60

- (1) los anticuerpos ejercen un efecto de inhibición de la migración de células de cáncer de pulmón;
 (2) los anticuerpos ejercen un efecto de inhibición de la invasión de células de cáncer de pulmón;
 (3) los anticuerpos ejercen un efecto de inhibición de la metástasis de células de cáncer de pulmón;
 65 (4) los anticuerpos ejercen un efecto de inhibición del crecimiento de células de cáncer de pulmón; o
 (5) los anticuerpos ejercen un efecto citotóxico frente a células de cáncer de pulmón.

La metástasis del cáncer se produce a través del proceso de:

desprendimiento/migración de fibras cancerosas desde la lesión primaria;
invasión en la matriz extracelular/membrana basal:

5 invasión en vasos sanguíneos;
 adhesión a sitios distantes;
 extravasación de vasos sanguíneos;
10 invasión en membrana basal/matriz extracelular; y crecimiento. De estos, la invasión en la matriz extracelular/
 membrana basal se produce dos veces, y por lo tanto se cree que son etapas altamente importantes. Las
 composiciones que comprenden un anticuerpo que tiene el efecto inhibidor que se ha descrito anteriormente
 son muy eficaces como un agente terapéutico para cáncer.

15 Además, las composiciones que comprenden un anticuerpo que tiene el efecto inhibidor que se ha descrito
 anteriormente al ejercer un efecto de inhibición del crecimiento de células cancerosas suprimen la progresión del
 cáncer y son muy eficaces como agentes terapéuticos para cáncer.

20 Además, los presentes inventores revelaron que los anticuerpos tienen citotoxicidad mediada por células
 dependientes de anticuerpos (ADCC). La ADCC es un mecanismo en el que la porción Fc de un anticuerpo
 terapéutico se une a receptores Fcγ en la superficie de linfocitos citolíticos que son capaces de eliminar las células
 cancerosas; los linfocitos citolíticos se guían a las células cancerosas mediante el efecto cognitivo de las acciones
 variables del anticuerpo terapéutico; y como resultado, los linfocitos citolíticos eliminan las células cancerosas a
25 través del anticuerpo terapéutico. Los presentes inventores confirmaron en primer lugar el efecto frente al cáncer de
 pulmón (H460-LNM35, A549, etc.). En particular, los anticuerpos ejercían el efecto incluso frente a la línea H460-
 LNM35 de células de cáncer de pulmón metastásicas que expresan CLCP1. Por lo tanto, se puede esperar que el
 efecto sinérgico en combinación con la supresión de la metástasis que se describe en el presente documento cure
 completamente el cáncer.

30 Además, como se describe en lo sucesivo en el presente documento, los presentes inventores confirmaron los
 diversos tipos de cánceres que expresan CLCP1 y sugirieron que también se podría esperar el mismo efecto en los
 cánceres. En particular, tales tipos de cáncer diana incluyen cáncer de riñón, tumor de vejiga, cáncer de próstata,
 cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, y cáncer de mama.

35 Las composiciones que comprenden un anticuerpo que ejerce la actividad descrita anteriormente mediante la
 producción de ADCC frente a células cancerosas eliminan los cánceres de forma. Por lo tanto, las composiciones
 son muy eficaces como un agente terapéutico anticáncer. Se demostró que los agentes terapéuticos para cáncer
 eran aplicables a diversos tipos de cáncer.

40 Al mismo tiempo, los presentes inventores evaluaron los anticuerpos obtenidos para su utilidad en el campo del
 diagnóstico. De forma específica, células y tejidos de cáncer de pulmón se inmunotñeron con los anticuerpos. El
 resultado mostraba que los anticuerpos podían teñir de forma específica el estado metastásico/ invasivo de células y
 tejidos de cáncer de pulmón, y cáncer de ganglios linfáticos metastásicos. De forma más específica, se pudieron
 teñir células y tejidos de pulmón normal, de cáncer de pulmón o cáncer de ganglios linfáticos metastásico, y
45 metástasis/invasión de forma distinguible usando los anticuerpos. Este resultado sugiere que el pronóstico,
 neoplasia de células de cáncer de pulmón (tejidos), y metástasis se pueden evaluar usando los anticuerpos
 obtenidos de forma satisfactoria. Además, el efecto terapéutico de agentes terapéuticos que se dirigen la molécula
 se pudo evaluar con los anticuerpos. Como se ha descrito anteriormente, se reveló que los anticuerpos obtenidos de
 forma satisfactoria eran inútiles en el diagnóstico de cáncer de pulmón y similares. Por lo tanto, se demostró que los
50 anticuerpos eran útiles en la tinción inmunológica de células cancerosas, en particular, secciones de tejido de cáncer
 de pulmón o cáncer de ganglios linfáticos metastásico, en el diagnóstico de progresión de metástasis de cáncer de
 pulmón o cáncer de ganglios linfáticos metastásico. En particular, se usan preferentemente para evaluar el
 pronóstico de cáncer de pulmón.

55 Además, los anticuerpos evaluaron por su capacidad de tinción en células cancerosas. CLCP1 es una molécula que
 no solamente se expresa en el cáncer de pulmón sino que también se expresa comúnmente en diversos tipos de
 cánceres, mientras que apenas se expresa en tejidos normales. Por lo tanto, se esperaba que CLCP1 se pudiera
 aplicar para evaluar el efecto terapéutico. En particular, tales tipos de cáncer diana incluyen cáncer de riñón, tumor
 de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, y cáncer de
60 mama.

 Además, las enfermedades diana en el diagnóstico del efecto terapéutico no se limitan a cáncer de pulmón en y
 cáncer de ganglios linfáticos metastásico, y se espera que los métodos de diagnóstico que usan los anticuerpos de
 la presente invención se puedan aplicar a otras enfermedades de expresión de CLCP1.

65 La presente invención se basa en los hallazgos que se han descrito anteriormente. Por lo tanto, la presente
 invención proporciona los siguientes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, y usos de los mismos:

[1] un anticuerpo aislado que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2;

[2] el anticuerpo de [1], que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las

5 posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2;

[3] el anticuerpo de [1], que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las

10 posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2;

[4] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [3], que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[5] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [3], que tiene una actividad de inhibición de la invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

15 [6] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [3], que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[7] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [3], que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1.

[8] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [3], que tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa que expresa CLCP1.

[9] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [4] a [8], en el que la célula cancerosa que expresa CLCP1 es una célula de cáncer de riñón, célula de tumor de vejiga urinaria, célula de cáncer de próstata, célula de cáncer de páncreas, célula de cáncer de estómago, célula de cáncer de intestino grueso, célula de cáncer de mama, o célula de cáncer de pulmón.

20 [10] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [9], en el que las secuencias de aminoácidos de cada una de las regiones determinantes de la complementariedad de región variable de cadena pesada (VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3) y cada una de las regiones determinantes de la complementariedad de región variable de cadena ligera (VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3) se seleccionan de (A) a (C):

(A)

30 (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

35 (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

40 (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(B)

45 (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

50 (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

55 (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(C)

60 (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

65 (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o una secuencia de aminoácidos

sustancialmente idéntica a la misma;

(5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

5 (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

[11] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [10], en el que las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) y la región variable de cadena ligera (VL) se seleccionan de (A) a (C):

10 (A)

(1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o 15, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

15 (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o 20, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(B)

20 (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(C)

25 (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

30 [12] un anticuerpo aislado que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo de uno cualquiera de [1] a [11];
[13] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [12], que es un, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, diacuerpo, o sc(Fv)₂;

[14] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [13], que es un anticuerpo de IgG;

35 [15] el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [14], que es un anticuerpo humanizado;

[16] un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [15];

[17] un vector que porta el ácido nucleico de [16] en una manera expresable;

[18] una célula transformada que comprende el vector de [17];

[19] un método para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de:

40 (a) cultivar la célula transformada de [18]; y
(b) aislar y purificar el anticuerpo como un producto de expresión;

45 [20] una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado de uno cualquiera de [1] a [15] y un vehículo farmacéuticamente aceptable;

[21] un agente para inhibir la migración de células cancerosas, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

50 [22] un agente para inhibir la invasión de células cancerosas, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[23] un agente para inhibir la metástasis de células cancerosas, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

55 [24] un agente para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

60 [25] un agente citotóxico frente a células cancerosas, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[26] un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento o prevención tumoral, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

65 [27] un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[28] el agente farmacéutico de [27] para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer que expresa CLCP1, que tiene al menos un efecto inhibidor seleccionado entre inhibición de la migración, inhibición de la invasión, inhibición de la metástasis, e inhibición del crecimiento;

[29] un agente farmacéutico para su uso en la detección inmunológica de la expresión de CLCP1 en una célula o tejido, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

[30] un kit para su uso en la detección inmunológica de la expresión de CLCP1 en una célula o tejido, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

[31] agente de diagnóstico para pronóstico de cáncer, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

[32] un kit de diagnóstico para pronóstico de cáncer, que comprende un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

[33] un método inmunológico que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una célula o tejido aislado con un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano; y

(b) detectar la expresión de CLCP1 en la célula o tejido;

[34] un método para diagnosticar cáncer, que comprende las etapas de poner en contacto un tejido patológico aislado con un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano, y detectar de forma inmunológica la expresión de CLCP1 en una célula del tejido patológico;

[35] un método de diagnóstico para pronóstico de cáncer, que comprende las etapas de poner en contacto un tejido patológico aislado con un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano, y detectar de forma inmunológica la expresión de CLCP1 en una célula del tejido patológico;

[36] un método para cribar una sustancia candidata que inhibe el crecimiento, invasión, migración, o metástasis de células cancerosas, o una sustancia candidata que tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto una sustancia de ensayo con un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

(b) detectar la unión entre una sustancia de ensayo y el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

y

(c) seleccionar una sustancia de ensayo que se une al dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano;

[37] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para inhibir una migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[38] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para inhibir una invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la invasión de la célula cancerosa que expresa CLCP1;

[39] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para inhibir una metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de la célula cancerosa que expresa CLCP1;

[40] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para inhibir un crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene la actividad de inhibir el crecimiento de la célula cancerosa que expresa CLCP1;

[41] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para dañar una célula cancerosa que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene citotoxicidad frente a la célula cancerosa que expresa CLCP1;

[42] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para tratar o prevenir un tumor que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene la actividad de inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[43] aunque no está de acuerdo con la presente invención, se desvela un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa CLCP1, que comprende la etapa de administrar a un sujeto un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1;

[44] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para inhibir la migración de la célula cancerosa que expresa CLCP1;

[45] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para inhibir la invasión de la célula cancerosa que expresa CLCP1;

- [46] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para inhibir la metástasis de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 5 [47] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- [48] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente citotóxico frente a la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 10 [49] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para tratar o prevenir un tumor que expresa CLCP1;
- [50] uso de un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1, para producir un agente para tratar o prevenir un cáncer que expresa CLCP1;
- 15 [51] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para inhibir la migración de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- [52] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para inhibir la invasión de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 20 [53] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para inhibir la metástasis de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 25 [54] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- [55] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para dañar la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 30 [56] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para tratar o prevenir un tumor que expresa CLCP1; y
- [57] un anticuerpo que reconoce un dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa CLCP1.
- 35

[Efectos de la Invención]

- 40 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales anti-CLCP1 humanos que reconocen de forma específica el dominio extracelular de CLCP1 humano, preferentemente anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2, más preferentemente anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2, o anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2, lo más preferentemente FA19-1, FA17-9, o 6AA_17-2, e incluso más preferentemente FA19-1 que se caracteriza por su reconocimiento específico del dominio extracelular de CLCP1 y fuerte inhibición de la actividad biológica de CLCP1, por ejemplo, actividad de señalización o interacción con otras moléculas, mediante unión a la proteína. Por primera vez, la presente invención proporciona anticuerpos monoclonales eficaces que inhiben crecimiento, migración, invasión, o metástasis celular (en particular, metástasis de cáncer de pulmón y metástasis de ganglios linfáticos), en los que se cree que está implicado, y tienen citotoxicidad en enfermedades cancerosas.
- 45
- 50 De acuerdo con la presente invención, se pueden producir fácilmente agentes para inhibir la migración, invasión, crecimiento, o metástasis de células cancerosas que expresan CLCP1, y agentes citotóxicos para dañar células cancerosas que expresan CLCP1, así como agentes terapéuticos para cáncer cuyo mecanismo de acción se basa en la inhibición que se ha descrito anteriormente, usando el anticuerpo que se ha descrito anteriormente como un principio activo. Estos agentes usan para tratar el cáncer/prevenir la metástasis de cáncer.
- 55
- 60 Además, la presente invención proporciona por primera vez anticuerpos monoclonales que tienen actividad citotóxica frente a enfermedades cancerosas de que expresan CLCP1.
- 65 De acuerdo con la presente invención, se pueden producir fácilmente agentes terapéuticos para cáncer cuyo mecanismo es dañar las cancerosas que expresan CLCP1 usando el anticuerpo que se ha descrito anteriormente como un principio activo. Estos agentes se pueden usar para tratar/prevenir enfermedades cancerosas.

Además, se demostró que CLCP1 se expresaba a niveles elevados en cáncer de pulmón y cáncer de ganglios linfáticos, y que la frecuencia de invasión/metástasis era más elevada cuando el nivel de expresión de CLCP1 era más elevado o la proporción de células que expresan CLCP1 era mayor en tejidos cancerosos. También se demostró que CLCP1 apenas se expresaba en tejidos normales mientras que se expresaba a niveles elevados en

5 diversos tipos de cánceres.

Por lo tanto, los anticuerpos que se han descrito anteriormente se usan para evaluar fácilmente la expresión de CLCP1 mediante tinción inmunológica de muestras de ensayo patológicas, y por lo tanto se pueden aplicar en el campo del diagnóstico. De forma específica, la expresión de CLCP1 se puede someter a ensayo usando agentes de

10 inmunotinción que comprenden el anticuerpo que se ha descrito anteriormente como un principio activo. En particular, la presente invención permite producir fácilmente agentes de inmunotinción para diagnóstico de síntomas/afecciones patológicas asociados con metástasis de cáncer, por ejemplo, agentes de inmunotinción para evaluar el efecto de agentes terapéuticos para cáncer, pronóstico o neoplasia.

15 Los tejidos de cáncer de pulmón se observaron después de tinción (tinción de la membrana celular) con un anticuerpo anti-CLCP1. En particular, la tasa de supervivencia analizada con el método de Kaplan-Meier a un año (12 meses) después de cirugía era de un 73 % en el grupo de casos clínicos fuertemente positivos en histoquímica (tinción fuertemente positiva de la membrana celular), mientras que la tasa era de un 93 % en el grupo de casos clínicos débilmente positivos o negativos (tinción débilmente positiva o negativa de la membrana celular). Por otro

20 lado, la tasa de supervivencia a tres años (36 meses) después de cirugía era de un 55 % en el grupo de casos fuertemente positivos, mientras que la tasa era de un 90 % en el grupo de casos débilmente positivos o negativos. La tasa de supervivencia era constantemente más baja en el grupo de casos fuertemente positivos. Las diferencias se evaluaron con en el ensayo de rango logarítmico o el ensayo de Wilcoxon generalizado (ensayo de Gehan-Wilcoxon), que se usan comúnmente para evaluar diferencias significativas en la tasa de supervivencia entre dos

25 grupos. El resultado fue $p = 0,012$ en el ensayo de rango logarítmico y $p = 0,0072$ en el ensayo de Wilcoxon generalizado, lo que sugiere que la tasa de supervivencia es de forma estadísticamente significativa menor en el grupo de casos fuertemente positivos (Fig. 37A).

La reactividad inmunohistoquímica de anticuerpos de la presente invención se clasificó en tres grupos: fuertemente

30 positivo (+), débilmente positivo (\pm), y negativo (-). De forma específica, fuertemente positivo se refiere a que la membrana celular está claramente teñida en su contorno (el contorno de la membrana celular es visible al microscopio) como se muestra en el panel superior de la Fig. 37B; débilmente positivo se refiere a que la membrana celular solo se tiñe ligeramente (el contorno de la membrana celular es invisible al microscopio) como se muestra en el panel inferior de la Fig. 37B; y negativo se refiere a que la membrana celular es completamente invisible.

35 De forma más específica, la presente invención proporciona kits para predecir el pronóstico de cáncer que comprenden un anticuerpo que se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la presente invención es útil porque se puede realizar un tratamiento inmediato o una nueva terapia para pacientes de alto riesgo de los que se predice que tienen un tiempo de supervivencia más corto. El tipo de cáncer diana preferente es el cáncer de pulmón.

40 La presente invención también proporciona métodos para evaluar sistemáticamente sustancias candidatas que inhiben el crecimiento, invasión, migración o metástasis de células cancerosas. Las sustancias obtenidas con los métodos de cribado pueden ser sustancias candidatas que se pueden usar para tratar o prevenir enfermedades cancerosas mediante los mecanismos de inhibición que se han descrito anteriormente.

45 **Breve descripción de las figuras**

Fig. 1 muestra en diagramas la estructura de la molécula de CLCP1.

Fig. 2 muestra en un diagrama la reactividad de anticuerpos anti-CLCP1 humano con respecto a células que expresan CLCP1. Un resultado de análisis de citometría de flujo (FCM) de células H460-LNM35 (cada anticuerpo monoclonal se detectó usando un anticuerpo IgG anti-ratón etiquetado con PE).

50 Fig. 3 muestra en gráficos un análisis de epítipo basado en experimentos de inhibición. Se analizaron tres clones altamente reactivos por FCM para evaluar el efecto inhibitor dependiente de la concentración de cada anticuerpo en presencia de una concentración constante de anticuerpo biotinilado. Se encontró que FA17-9 y FA19-1 se inhibían entre sí, lo que sugiere que comparten el mismo epítipo o sus epítipo se sitúan muy cerca entre sí. EC6-8 no inhibía ni a FA17-9 ni a FA19-1. Por lo tanto, se supone que EC6-8 reconoce un epítipo que es diferente de los reconocidos por FA17-9 y FA19-1.

55 Fig. 4 muestra en una fotografía y un diagrama un experimento para identificar el epítipo reconocido por el anticuerpo EC6-8. El dominio de FA58C inmunoprecipitó de forma satisfactoria con EC6-8. Por lo tanto, se demostró que EC6-8 reconoce el dominio de FA58C.

60 Fig. 5 muestra en un gráfico del análisis de afinidad por FCM.

Fig. 6: A muestra en un gráfico la actividad de los anticuerpos para inhibir la invasión celular. El eje horizontal indica el número del anticuerpo y el eje vertical indica la actividad de inhibición de la invasión celular cuando la actividad del control negativo (simulado) se toma como un 100 %. La barra abierta indica el resultado de detección en el grupo de ensayo usando fracciones de anticuerpo IgG, mientras que la barra rellena (simulado) indica la detección en el grupo de control. B muestra en un gráfico la actividad de los anticuerpos para inhibir la

migración celular. El eje horizontal indica el número del anticuerpo y el eje vertical indica la actividad de inhibición de la migración celular cuando la actividad del control negativo (simulado) se toma como un 100 %. Las barras abiertas indican el resultado de detección en el grupo de ensayo usando fracciones de anticuerpo IgG, mientras que las barras rellenas (simulado) indican detección en el grupo de control.

Fig. 7 muestra en fotografías la evaluación funcional de los anticuerpos monoclonales. (A) panel superior: transferencia de Western de lisados celulares de H460-LNM35 después de exposición a cada anticuerpo; (A) panel inferior: transferencia de Western de inmunoprecipitados preparados usando cada anticuerpo; (B): transferencia de Western de lisados celulares de H460-LNM35 después de exposición a cada anticuerpo en las concentraciones indicadas. En cada experimento, CLCP1 se detectó usando FA19-1 y un anticuerpo IgG anti-ratón etiquetado con HRP.

Fig. 8 muestra en fotografías la evaluación de la capacidad de tinción de anticuerpos monoclonales. A, tinción celular; B y C, tinción de tejido canceroso. A: se demostró que solamente se podía usar FA19-1 en inmunohistoquímica de muestras embebidas en parafina en las condiciones experimentales usadas en la presente invención. B: la membrana celular se tiñó en el tejido canceroso (carcinoma de pulmón de células escamosas) de la muestra de ensayo 1. B panel izquierdo: histoquímica de carcinoma de pulmón de células escamosas. El cáncer de pulmón era uniformemente positivo para la tinción de la membrana celular. Éste resultado es coherente con el área de cáncer identificada de forma patológica. B panel medio: el área de invasión de cáncer en la región normal se tiñó positivamente, en la región normal se tiñó negativamente. Por lo tanto, las áreas normal e invadida se separaban claramente mediante tinción. Este resultado es coherente con el área de cáncer identificado de forma patológica. B panel derecho: imagen de tinción para el tejido de pulmón normal: tinción negativa. Los puntos de color negro visibles en el panel son sitios de deposición de grano de hierro. La membrana celular también se tiñó en la muestra de ensayo 2 de tejido canceroso (adenocarcinoma de pulmón), en la que el citoplasma también se tiñó. C panel izquierdo: la tinción del tejido de cáncer de pulmón era uniformemente positiva. La tinción de la superficie celular era fuertemente positiva. El citoplasma también estaba teñido. C panel medio: otras porciones del tejido de cáncer de pulmón estaban teñidas principalmente de forma positiva. Sin embargo, la tinción era ligeramente no uniforme. C panel derecho: un área del tejido de pulmón normal alejada del cáncer estaba teñida de forma negativa. Los puntos de color negro visibles en el panel son sitios de deposición de grano de hierro.

Fig. 9 muestra en un diagrama las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo FA17-9. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada (una porción de la región variable y la región constante). Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 7), CDR2 (SEQ ID NO: 8), y CDR3 (SEQ ID NO: 9) de la parte superior. La flecha indica CH1. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera (una porción de las regiones variable y constante). Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 12), CDR2 (SEQ ID NO: 56), y CDR3 (SEQ ID NO: 13) de la parte superior. La flecha indica CL1.

Fig. 10 muestra en un diagrama las secuencias de nucleótidos y aminoácidos del anticuerpo FA19-1. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada (una porción de las regiones variable y constante). Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 16), CDR2 (SEQ ID NO: 17), y CDR3 (SEQ ID NO: 18) de la parte superior. La flecha indica CH1. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera (una porción de las regiones variable y constante). Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 21), CDR2 (SEQ ID NO: 57), y CDR3 (SEQ ID NO: 22) de la parte superior. La flecha indica CL1.

Fig. 11 muestra en un diagrama la comparación de las secuencias de anticuerpo. FA17-9 y FA19-1 se obtienen a partir de la misma línea germinal, y se diferencian solamente en algunos aminoácidos debido a mutación somática.

Fig. 12 muestra en fotografías análisis de transferencia de Western de cada anticuerpo para CLCP1 endógeno. Los lisados celulares se prepararon a partir de la línea precursora H460-LNM35 y la sublínea H460-LNM35 que expresa de forma constitutiva ARN horquillado corto (ARNhc) biosintetizado por vía intracelular con respecto a ARNsi frente a CLCP1 (línea n.º 9 de células siCLCP1-3; Nagai H, *et al.*, *Oncogene* (2007) 26: 4025-4031) (calle, LNM35-siCLCP1). Se demostró que el nivel de expresión del ARNm de CLCP1 estaba reducido de forma significativa en la línea n.º 9 de células siCLCP1-3. La transferencia de Western se realizó usando los lisados celulares y cada uno de los anticuerpos indicados. Como resultado, FA19-1, FA17-9, y FA16-3 daban señales de un tamaño idéntico. Sin embargo, la señal era muy débil con FA16-3. Los resultados de la transferencia de Western mostraban que FA19-1 y FA17-9 podrían reconocer de forma específica y eficaz el CLCP1 endógeno.

Fig. 13 muestra en una fotografía la transferencia de Western para CLCP1 en LNM35 después de exposición a FA17-9 o FA19-1. Las células LNM35 se expusieron a FA17-9 o FA19-1 a las concentraciones indicadas durante 24 horas, y a continuación se usaron cantidades iguales de lisados celulares para el análisis de transferencia de Western media con nte FA19-1 de la misma manera que se ha descrito en la Fig. 7 (B). El resultado sugería que la degradación (internalización) de CLCP1 estaba inducida por FA17-9 y FA19-1 a una concentración de 0,5 µg/ml.

Fig. 14 muestra en gráficos el análisis de citometría de flujo después de exposición a cada anticuerpo. El análisis de citometría de flujo se realizó para cada uno de IgG de ratón de control, FA17-9, y FA19-1 después de exposición de 24 h a una concentración de 1 o 5 µg/ml, seguido de lavado con PBS. La exposición a FA19-1 redujo la reactividad con respecto al CLCP1 de la superficie celular. Esto sugiere que la degradación de CLCP1 (internalización) se inducía en la superficie celular.

Fig. 15 muestra en gráficos los resultados de la observación de cambios en la metástasis de pulmón y ganglios

linfáticos como resultado de la administración del anticuerpo después de que a los ratones atímicos KSN/slc se les trasplantaran células LNM35 bajo la piel en la región inguinal izquierda. (A) Volumen tumoral el día 10 (10 días después del trasplante); (B) volumen tumoral el día 34 (34 días después del trasplante); (C) volumen tumoral el día 41 (41 días después del trasplante); y (D) tasa de crecimiento tumoral. El eje vertical indica volumen tumoral (mm³), y el eje horizontal indica periodo después del trasplante.

Fig. 16 muestra en gráficos el resultado 46 días después del trasplante en el momento de sacrificio. (A) No hay cambio en el peso corporal excluyendo el peso del tumor. (B) La tendencia de FA19-1 es suprimir el crecimiento. Al mismo tiempo, parece que FA17-9 estimula el crecimiento, pero no hay diferencia significativa. (C) FA19-1 suprime de forma significativa la metástasis. La tendencia de FA17-9 también es suprimir la metástasis. (D) Normalmente se observa ampliación en los tres grupos, y el más evidente se produce en el grupo de IgG de control. (E) aunque no hay diferencia significativa debido a la variación en el control, la ampliación del ganglio linfático causada por metástasis apenas se observa en los grupos de FA17-9 y FA19-1. (F) Aunque no existe diferencia significativa debido a la variación en el control, la ampliación del ganglio linfático causada por metástasis apenas se observa en los grupos de FA17-9 y FA19-1.

Fig. 17 muestra en un diagrama el aislamiento de la línea NCI-H460-LNM35 altamente metastásica y de la línea NCI-H460-N15 de baja metástasis, ambas de las cuales se obtienen a partir de NCI-H460, y el resultado del análisis de expresión de CLCP1. Tanto NCI-H460-LNM35 como NCI-H460-N15, se expresan de forma uniforme CLCP1 en la membrana celular, se pudieron aislar por clonación de la línea precursora NCI-H460, que es una población de células heterogéneas, de acuerdo con la resistencia de la capacidad metastásica. Esto aclara la correlación entre la capacidad metastásica y el nivel de expresión en la membrana celular.

Fig. 18 muestra en gráficos el análisis de citometría de flujo de líneas de células de cáncer de pulmón distintas a la línea NCI-H460 usando un anticuerpo anti-CLCP1 (FA19-1). Como control se usó IgG1 de ratón. El análisis de citometría de flujo se realizó después de tinción a una concentración de anticuerpo de 5 µg/ml.

Fig. 19 muestra en gráficos el análisis de citometría de flujo de diversas líneas de células de cáncer usando un anticuerpo anti-CLCP1 (FA19-1). Como control se usó IgG1 de ratón. El análisis de citometría de flujo se realizó después de tinción a una concentración de anticuerpo de 5 µg/ml.

Fig. 20 es un gráfico que muestra el nivel de expresión de antígeno (intensidad de fluorescencia media) en diversas líneas de células de cáncer. Diversas líneas de células de cáncer (eje horizontal) se analizaron mediante citometría de flujo usando un anticuerpo anti-CLCP1 (FA19-1) a una concentración de 5 µg/ml. El eje vertical de este gráfico indica intensidad de fluorescencia media (MFI). Se demostró que CLCP1 se expresaba en líneas celulares de cáncer de riñón, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, y cáncer de mama, además de cáncer de pulmón. Diversas líneas de células de cáncer, y sus orígenes y números de registro se enumeran en la Tabla 2.

Fig. 21 muestra en gráficos el resultado de la evaluación de la reactividad del anticuerpo FA17-9 quimérico y el anticuerpo FA19-1 quimérico. Los anticuerpos quiméricos se produjeron para que tuvieran regiones constantes obtenidas a partir de IgG1 humana y regiones variables obtenidas a partir de FA17-9 o FA19-1. Sus actividades de unión a NCI-H460-LNM35 se evaluaron mediante citometría de flujo.

Fig. 22 muestra en gráficos el resultado de la evaluación de la actividad de ADCC del anticuerpo FA19-1 quimérico o anticuerpo FA17-9 quimérico frente a células LNM35. La ADCC de cada anticuerpo quimérico frente a células NCI-H460-LNM35 se evaluó cambiando la concentración de anticuerpo (Fig. 22, panel superior (A)) o la proporción de E/T (proporción de efector/diana) (Fig. 22, panel inferior (B)).

Fig. 23 muestra en gráficos resultados de la evaluación de la actividad de ADCC de anticuerpo FA19-1 quimérico frente a NCI-H460-LNM35 o A549. Este resultado muestra el análisis del uso de diferentes donantes efectores en el ensayo de ADCC. La actividad de ADCC del anticuerpo FA19-1 quimérico se confirmó tanto frente a NCI-H460-LNM35 (Fig. 23 panel superior) como a A549 (Fig. 23 panel inferior), aunque variaba en cierta medida dependiendo del tipo de donante (A a E). Se demostró que el anticuerpo FA19-1 quimérico y el anticuerpo FA17-9 quimérico mediaban la ADCC frente células de cáncer de pulmón a las que se han descrito anteriormente.

Fig. 24 muestra en un gráfico el resultado de la evaluación de la afinidad de unión de los nuevos anticuerpos por FCM. El valor de la constante de unión (afinidad) se puede determinar a partir de la concentración de anticuerpo y la intensidad de fluorescencia media (MFI) determinado mediante análisis de FCM. Se demostró que la constante de unión (afinidad) aumentaba en el siguiente orden: 2AA_171-1 > 6AA_17-2 ≈ 2AA_197-3 > A19-1 ≈ 2AA_83-6 > 2AA_111-3 > 6AA_60-1.

Fig. 25 muestra en un diagrama de formación de mapas de epítomos de los nuevos anticuerpos. Los dominios de reconocimiento se calcularon basándose en la reactividad de ELISA con respecto a fragmentos de proteína parcial. El ELISA se realizó mediante sensibilización de todo el dominio extracelular (barras abiertas) o una región que contenía FA58C (barras rellenas).

Fig. 26 muestra en diagramas el resultado de la supresión de la metástasis de pulmonar 46 días después del trasplante en el momento de sacrificio, de la misma manera que se muestra en la Fig. 16 (C). (A) FA19-1 suprimía la metástasis de forma significativa. Un experimento adicional demostraba que FA17-9 también suprimía la metástasis. (B) Tanto FA19-1 como 6AA_17-2 suprimían la metástasis de forma significativa.

Fig. 27 muestra en un diagrama y gráficos los resultados obtenidos mediante la reducción del epítomo del que se predijo que era reconocido por los nuevos anticuerpos (reactividad con respecto a un antígeno parcial expresado). Para reducir el sitio de unión, la unión (reactividad) de los anticuerpos 6AA_17-2, EC6-8, y FA19-1 a antígenos parciales se evaluó mediante ELISA.

Fig. 28 muestra en diagrama y gráficos resultados obtenidos mediante la reducción del epítomo del que se predijo que era reconocido por un nuevo anticuerpo (reactividad con respecto a un antígeno parcial expresado). La unión

(reactividad) del anticuerpo FA19-1 a antígenos parciales se evaluó mediante ELISA.

Fig. 29 muestra en diagrama y gráficos resultados obtenidos mediante la reducción del epítipo del que se predijo que era reconocido por un nuevo anticuerpo (reactividad con respecto a un antígeno parcial expresado). La unión (reactividad) del anticuerpo 6AA_17-2 a antígenos parciales se evaluó mediante ELISA.

Fig. 30 muestra en diagrama y gráficos resultados obtenidos mediante la reducción del epítipo del que se predijo que era reconocido por un nuevo anticuerpo (reactividad con respecto a un antígeno parcial expresado). La unión (reactividad) del anticuerpo EC6-8 a antígenos parciales se evaluó mediante ELISA.

Fig. 31 muestra en gráficos formación de mapas de epítipos de los nuevos anticuerpos. Predicción basada en experimentos de inhibición competitiva con FCM. (A) ensayo de inhibición de 2AA_197-3: el único anticuerpo que compite es el propio 2AA_197-3, y por lo tanto se demostró que el epítipo era único y diferente de los epítipos reconocidos por los otros anticuerpos. (B) ensayo de inhibición de 2AA_171-1: el único anticuerpo que compite es el propio 2AA_171-1, y por lo tanto se demostró que el epítipo era único y diferente de los epítipos reconocidos por los otros anticuerpos. (C) ensayo de inhibición de 6AA_17-2: 6AA_17-2 competía con EC6-8 y FA19-1, y por lo tanto llegó a quedar claro que reconoce un epítipo adyacente a los epítipos reconocidos por los otros dos clones.

Fig. 32 muestra la especulación de los epítipos basándose en sumarios de los resultados de ELISA mostrados en las Figs. 27 a 30, y ensayos de inhibición competitiva de FCM en las Figs. 3 y 31. Se reveló que 6AA_17-2, EC6-8, y FA19-1 reconocían epítipos adyacentes entre sí. Se identificó cada secuencia de epítipo. El epítipo reconocido por EC6-8 está marcado con líneas discontinuas.

Fig. 33 muestra el resultado de la formación de grupos de epítipo basándose en sumarios de los resultados de inhibición competitiva de FCM. Los que se encuentran en la misma caja competían entre sí en el ensayo de inhibición competitiva de FCM.

Fig. 34 muestra en diagramas análisis de citometría de flujo después de exposición a los nuevos anticuerpos. Las células LNM35 se expusieron a los nuevos anticuerpos a las concentraciones indicadas durante 24 horas. Después de lavado con PBS, el análisis de citometría de flujo se realizó usando un anticuerpo biotinilado. El resultado sugería que los anticuerpos 2AA_171-1, 6AA_17-2, y 2AA_197-3 inducían fuertemente la degradación de CLCP1 (internalización).

Fig. 35 muestra en una fotografía la transferencia de Western para CLCP1 en LNM35 después de exposición a anticuerpo. Como anticuerpo de control se usó IgG1 de ratón. Después de 24 horas de exposición a cada anticuerpo a una concentración de 5 µg/ml, se evaluaron cantidades equivalentes de lisados celulares mediante análisis de transferencia de Western usando FA19-1. El resultado sugería que al igual que para FA17-9 y FA19-1, los anticuerpos 2AA_171-1, 6AA_17-2, y 2AA_197-3 inducían degradación (internalización) de CLCP1.

Fig. 36 muestra en un diagrama el efecto de los nuevos anticuerpos en la internalización. El efecto de internalización se muestra como porcentaje de actividad cuando se toma la actividad de internalización de la muestra de anticuerpo de control como un 100 %. El efecto de internalización de FA19-1 en NCI-H460-LNM35 y A549 se indica con flecha. La cantidad de antígeno CLCP1 humano en la superficie celular se redujo por reacción de las células con los anticuerpos. Se puede suponer que la internalización del CLCP1 humano en las células se indujo mediante unión a anticuerpo. Esta tendencia se puede observar con otros tipos de células.

Fig. 37 muestra en un gráfico y fotografías la predicción del pronóstico mediante tinción histológica. (A) Las muestras de ensayo de cáncer de pulmón se tiñeron usando el anticuerpo FA19-1 con el método de tinción que se ha descrito anteriormente. Basándose en la tinción de la membrana celular, las muestras de ensayo se agruparon en casos fuertemente positivos: 11, casos débilmente positivos: 7, y casos negativos: 52. El grupo de casos fuertemente positivos se comparó con los grupos de casos débilmente positivos/negativos mediante análisis de Kaplan-Meier. El pronóstico en los casos fuertemente positivos fue $p = 0,012$ en el ensayo de rango logarítmico, lo que muestra que la tasa de supervivencia era baja de forma estadísticamente significativa. La barra vertical indica casos que no podían alcanzar el "punto final = muerte" durante los periodos de observación (casos de supervivencia) (es decir, "caso censurado"). (B) muestra la diferencia de tinción entre casos fuertemente positivos y casos débilmente positivos. Las reactividades inmunohistológicas del anticuerpo se agruparon en tres grupos: fuertemente positivo (+), débilmente positivo (\pm), y negativo (-). De forma específica los casos en los que la membrana celular está claramente teñida en el contorno como se muestra en el panel superior se definen como fuertemente positivos; los casos en los que la membrana celular sólo está ligeramente teñida como se muestra en el panel inferior se definen como débilmente positivos; y los casos en los que la membrana celular no está teñida se definen como negativos (los datos no se muestran).

Fig. 38 muestra en diagramas las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de regiones variables del anticuerpo 6AA_17-2. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena pesada (región variable) se muestran en las SEQ ID NOs: 58 y 59, respectivamente. Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 60), CDR2 (SEQ ID NO: 61), y CDR3 (SEQ ID NO: 62) de la parte superior. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de la cadena ligera (región variable) (SEQ ID NOs: 63 y 64), respectivamente. Las regiones encerradas en cajas corresponden a la secuencia señal, CDR1 (SEQ ID NO: 65), CDR2 (SEQ ID NO: 66), y CDR3 (SEQ ID NO: 67) de la parte superior.

Fig. 39 muestra en un gráfico el resultado de la determinación de la constante de disociación de cada anticuerpo medida mediante ensayo de Biacore.

Fig. 40 muestra en diagramas el proceso de humanización de una cadena pesada. A muestra FA19RHA (humanizado) y la secuencia del anticuerpo humano seleccionado. U00570 es la secuencia del anticuerpo humano seleccionado. Las porciones de CDR se convirtieron en las de FA19-1. B muestra el % identidad del aminoácido en el armazón. El anticuerpo humanizado construido y FA19-1 tienen una identidad de aminoácidos

de un 77,0 % en sus armazones.

Fig. 41 muestra en diagramas el proceso de humanización de una cadena ligera. A muestra FA19RKA (humanizado) y la secuencia del anticuerpo humano seleccionado. U96396 es la secuencia del anticuerpo humano seleccionado. Las porciones de CDR se convirtieron en las de FA 19-1. B muestra el % identidad del aminoácido en el armazón. El anticuerpo humanizado construido y FA19-1 tienen una identidad de aminoácidos de un 78,8 % en sus armazones.

Fig. 42 muestra en un gráfico la actividad de unión del anticuerpo sustituido con serina con respecto al dominio extramembrana en ELISA. Se evaluó la actividad de unión del anticuerpo obtenido por conversión de la cisteína en la CDR de la cadena ligera del anticuerpo FA19-1 en serina. El anticuerpo sustituido con serina construido presentaba una actividad de unión comparable con la del anticuerpo antes de su conversión.

Fig. 43 muestra en un gráfico la actividad de ELISA con respecto al dominio extramembrana (comparación de of IgG1 humanizada e IgG1 quimérica). La actividad de unión del anticuerpo humanizado preparado se evaluó mediante ELISA. El anticuerpo humanizado preparado presentaba una actividad de unión comparable con la del anticuerpo quimérico.

Fig. 44 muestra en diagramas los resultados del análisis de la reactividad de diversos anticuerpos con respecto a proteínas de fusión de GST y secuencias peptídicas a partir de la división de la región de aa 451 - aa 475 de CLCP1 en cuatro tipos de péptidos mediante ELISA. Las actividades de unión de FA17-9, FA19-1, 6AA_17-2, y EC6-8 se evaluaron mediante ELISA usando placas inmovilizadas con las diversas proteínas de GST obtenidas a 0,5 µg/ml. FA17-9 y FA19-1 presentaban actividad de unión con respecto a aa 461 - aa 470 de la SEQ ID NO: 2, mientras que 6AA_17-2 presentaba actividad de unión con respecto a aa 456 - aa 465 de la SEQ ID NO: 2.

Modo para realizar la invención

(Términos)

En el presente documento, la expresión "anticuerpo aislado" no incluye anticuerpos naturales que no se hayan manipulado de forma externa (manipulados artificialmente), es decir, anticuerpos que se producen y permanecen en un individuo. Por lo general un anticuerpo aislado existe solo (como una población de anticuerpos idénticos), y no se mezcla con otros tipos de anticuerpos.

Con respecto a la terminología usada para describir secuencias de aminoácidos, la expresión "sustancialmente idéntica" se refiere a que la diferencia de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos que se comparan es relativamente pequeña, y por lo tanto no influye sustancialmente en la unión específica a un antígeno. Las secuencias de aminoácidos sustancialmente idénticas son secuencias de aminoácidos que incluyen alteraciones parciales que no incluyen sustancialmente en la unión específica a un antígeno cuando se comparan con una secuencia de aminoácidos convencional. En el presente documento, "alteración parcial de una secuencia de aminoácidos" se refiere a que una secuencia de aminoácidos cambia debido a una delección o sustitución de uno o más aminoácidos que constituyen la secuencia de aminoácidos, o adición o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos, o una combinación de los mismos. La posición de la mutación en una secuencia de aminoácidos no está limitada en particular; y la secuencia de aminoácidos puede contener mutaciones en una pluralidad de posiciones. En el presente documento, pluralidad se refiere a un número que corresponde, por ejemplo, a un 10 % o inferior de los aminoácidos totales que constituyen una secuencia de aminoácidos, preferentemente un 5 % o inferior de los aminoácidos totales, y más preferentemente un 1 % o inferior de los aminoácidos totales.

Cuando dos secuencias de aminoácidos son sustancialmente idénticas entre sí, se pueden evaluar mediante comparación de la especificidad de unión de los anticuerpos que tienen cada secuencia de aminoácidos (las secuencias de las otras regiones son las mismas) a un antígeno (en lo sucesivo en el presente documento, "especificidad" se refiere a la "especificidad con respecto al antígeno", a menos que se describa de otro modo). Por ejemplo, cuando la constante de disociación (K_d) de un anticuerpo patrón con respecto a su antígeno en solución salina fisiológica es A, se puede considerar que un anticuerpo que se está comparando es sustancialmente idéntico cuando la K_d del anticuerpo que se está comparando está dentro de un intervalo de $A \times 10^{-1}$ a $A \times 10$.

Con respecto a la terminología usada para describir la constante de unión de un anticuerpo, la expresión "sustancialmente idéntica con respecto a o superior a" se refiere a que cuando las constantes de unión de los anticuerpos son sustancialmente idénticas entre sí, e pueden evaluar mediante comparación de la especificidad de unión antígeno entre los anticuerpos respectivos (en lo sucesivo en el presente documento, "especificidad" se refiere a "especificidad con respecto al antígeno", a menos que se describa de otro modo). Por ejemplo, cuando la constante de disociación (K_d) de un anticuerpo patrón con respecto a su antígeno en solución salina fisiológica es A, se puede considerar que un anticuerpo que se está comparando es sustancialmente idéntico cuando la K_d del anticuerpo que se está comparando es $0,9 \times A$ o superior.

En el presente documento, la expresión "ácido nucleico aislado" por lo general se refiere a un ácido nucleico originalmente presente en la naturaleza (por ejemplo, un ácido nucleico en un organismo vivo humano) está en un estado separado de los otros ácidos nucleicos coexistentes en la naturaleza. Sin embargo, el ácido nucleico puede

incluir parte de otro ácido nucleico, por ejemplo, parte de la secuencia de ácidos nucleicos adyacente en el estado natural. Por ejemplo, en el caso de ADN genómico, una realización preferente del "ácido nucleico aislado" en el caso del ADN genómico, otros componentes del ADN coexistente en el estado natural (incluyendo secuencia de ADN adyacente en el estado natural) no están contenidos sustancialmente.

5 Por ejemplo, un "ácido nucleico aislado" como una molécula de ADNc, que se produce mediante técnicas recombinantes, es preferentemente un ácido nucleico que esta sustancialmente libre de otros componentes celulares, solución de cultivo, y similares De forma análoga, cuando el "ácido nucleico aislado" se produce mediante síntesis química, es preferentemente un ácido nucleico en un estado que esté sustancialmente libre de precursores químicos (materiales de partida) tales como los dNTP u otros agentes químicos usados en el proceso de síntesis.

10 Un ácido nucleico que está presente como parte de un vector o composición, o un ácido nucleico que está presente en una célula como una molécula exógena se puede denominar "ácido nucleico aislado" siempre y cuando esté presente como resultado de manipulación artificial. A menos que se indique de otro modo, "ácido nucleico" en la presente invención se refiere a "ácido nucleico en un estado aislado".

15 En el presente documento, la expresión "ácido nucleico" incluye ADN (incluyendo ADNc y ADN genómico), ARN (incluyendo ARNm), análogos de ADN, y análogos de ARN. La forma del ácido nucleico de la presente invención no está limitada, y de forma específica puede ser monocatenario o bicatenario. Sin embargo, es preferente el ADN bicatenario. También se tiene en cuenta la degeneración del codón. De forma específica, el ácido nucleico que codifica una proteína puede tener cualquier secuencia de nucleótidos siempre y cuando la proteína se obtenga como un producto de expresión del ácido nucleico. En el presente documento, el "ácido nucleico que codifica una proteína (por ejemplo, un anticuerpo)" se refiere a un ácido nucleico que se expresa para producir la proteína, e incluye no solamente ácidos nucleicos que tienen una secuencia de nucleótidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la proteína sino también ácidos nucleicos que resultan de la adición de una secuencia que no codifica secuencia de aminoácidos con respecto al ácido nucleico que se ha descrito anteriormente (por ejemplo, ADN incluye uno o más intrones).

20 En el presente documento, "cáncer de pulmón" se interpreta ampliamente, e incluye carcinoma de pulmón y sarcoma de pulmón. En el presente documento, los términos "cáncer" y "tumor" se usan indistintamente. Además, "cáncer" puede incluir tumor benigno, afección patológica del límite benigno/maligno, y tumor maligno en un estadio antes de confirmar el diagnóstico patológico (es decir, antes de confirmar el carácter benigno y maligno de una neoplasia).

25 En el presente documento, si fuera necesario, las siguientes abreviaturas (dentro de los paréntesis) se buscan de acuerdo con la práctica.

30 Cadena pesada (cadena H), cadena ligera (cadena L), región variable de cadena pesada (VH), región variable de cadena ligera (VL), región determinante de la complementariedad (CDR), primera región determinante de la complementariedad (CDR1), segunda región determinante de la complementariedad (CDR2), tercera región determinante de la complementariedad (CDR3), primera región determinante de la complementariedad de cadena pesada (VH CDR1), segunda región determinante de la complementariedad de cadena pesada (VH CDR2), tercera región determinante de la complementariedad de cadena pesada (VH CDR3), primera región determinante de la complementariedad de cadena ligera (VL CDR1), segunda región determinante de la complementariedad de cadena ligera (VL CDR2), y tercera región determinante de la complementariedad de cadena ligera (VL CDR3).

35 (Anticuerpo anti-CLCP1 humano)

40 En el primer aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos aislados (en lo sucesivo en el presente documento, también denominados "anticuerpos de la presente invención") que reconocen de forma específica ("reconocen" se puede decir con otras palabras como "unir"; "reconocer" se refiere a que reconoce un epitopo en un antígeno) el dominio extracelular (SEQ ID NO: 3) de CLCP1 humano (las secuencias de nucleótidos y aminoácidos se muestran en las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente). Los anticuerpos reconocen una región que incluye el dominio FA58C (SEQ ID NO: 4) en el dominio extracelular de CLCP1 humano.

45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2.

50 Preferentemente, los anticuerpos aislados reconocen el péptido que se describe en (c) que sigue a continuación y no reconocen al menos uno cualquiera de los péptidos que se describen en (a), (b), y (d) que siguen a continuación, o reconocen el péptido que se describe en (b) que sigue a continuación y no reconocen al menos uno cualquiera de los péptidos que se describen en (a), (b), y (d) que siguen a continuación.

- 55 (a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2
 (b) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2
 60 (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2
 (d) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2

Más preferentemente, los anticuerpos aislados reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2, pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, los anticuerpos aislados reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2, pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2.

Incluso más preferentemente, los anticuerpos aislados se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2, pero no se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2 y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, los anticuerpos aislados se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2, pero no se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470.

Más preferentemente, los anticuerpos aislados reconocen el péptido que se describe en (c) que sigue a continuación y no reconocen ninguno de los péptidos que se describen en (a), (b), y (d) que siguen a continuación, o reconoce el péptido que se describe en (b) que sigue a continuación y no reconocen ninguno de los péptidos que se describen en (a), (c), y (d) que siguen a continuación:

- (a) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2
- (b) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2
- (c) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2
- (d) un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2

Los anticuerpos de la presente invención ejercen la actividad/efecto mediante reconocimiento de antígeno CLCP1 humano. De forma específica, los anticuerpos de la presente invención ejercen la actividad frente a células de cáncer humano que expresan una molécula de CLCP1 humano en la superficie celular, preferentemente células cancerosas que expresan una molécula de CLCP1 humano a niveles elevados, más preferentemente células de cáncer de pulmón, y especialmente células de cáncer de pulmón metastásicas. Tales actividades de los anticuerpos de la presente invención incluyen actividad inhibitoria de la migración, actividad inhibitoria de la invasión, actividad inhibitoria de la metástasis, y actividad inhibitoria del crecimiento. En otro aspecto, tal actividad es la citotoxicidad (por ejemplo, ADCC).

Se ha sabido que la molécula de CLCP1 humano se expresa a niveles elevados en células de cáncer de pulmón. Sin embargo, se sabe poco con respecto a la expresión en otros tipos de cánceres y con respecto a funciones del anticuerpo frente al dominio extracelular de CLCP1 humano. Como se describe a continuación, los presentes inventores obtuvieron hallazgos interesantes a través de estudios.

Los anticuerpos de la presente invención ejercen:

- (1) actividad inhibitoria de migración mediante reconocimiento del antígeno CLCP1 humano expresado en células de cáncer de pulmón humano;
- (2) actividad inhibitoria de invasión mediante reconocimiento del antígeno CLCP1 humano expresado en células de cáncer de pulmón humano;
- (3) actividad inhibitoria de metástasis mediante reconocimiento del antígeno CLCP1 humano expresado en células de cáncer de pulmón humano; y/o
- (4) actividad inhibitoria del crecimiento mediante reconocimiento del antígeno CLCP1 humano expresado en células de cáncer de pulmón humano. En otro aspecto, los anticuerpos de la presente invención ejercen citotoxicidad mediante reconocimiento del antígeno CLCP1 humano expresado en diversas células cancerosas.

En el presente documento, "actividad inhibitoria de migración" se refiere a la actividad de inhibir la migración bi- o tri-dimensional de células viables *in vitro* o *in vivo*. En el presente documento, "actividad inhibitoria de invasión" se refiere a la actividad de inicio de la migración de células viables a través de la membrana basal *in vivo*, o *in vitro* para inhibir la migración de células vivas de las cámaras superior a inferior, que están separadas con una membrana de matriz extracelular o matrigel. La "actividad inhibitoria de la metástasis" se refiere a la actividad de inhibir la difusión *in vivo* de células cancerosas a otros órganos o ubicaciones diferentes del mismo órgano mediante desprendimiento/migración de la lesión primaria e invasión en la matriz celular/ membrana basal. La "actividad inhibitoria del crecimiento" se refiere a la "actividad de supresión de la división de células cancerosas/crecimiento de cáncer y de ese modo reducir el volumen de células cancerosas o suprimir el aumento en peso en comparación con un grupo de IgG de control", como resultado de la administración de un anticuerpo de la presente invención y posterior observación. En el presente documento, "citotoxicidad" se refiere a la "actividad de reducir el número o volumen de células cancerosas viables en comparación con un grupo de IgG de control" dañando las células cancerosas.

En la presente invención, "inhibición de migración, invasión, metástasis, o crecimiento" incluye no solamente la inhibición completa sino también la inhibición parcial de la migración, invasión, metástasis, o crecimiento. "Citotoxicidad" incluye no solamente daño completo sino también daño parcial de poblaciones de células

cancerosas. El Documento de No Patente 4 mostraba que la actividad inhibitoria de migración y la actividad inhibitoria de invasión *in vitro* están correlacionadas con la "actividad inhibitoria de la metástasis" *in vivo*.

5 Se reveló que el nivel del antígeno CLCP1 humano en la superficie celular disminuía cuando se hacía reaccionar un anticuerpo de la presente invención se hizo reaccionar con las células. Se puede suponer la razón de que la unión del anticuerpo inducía la internalización del CLCP1 humano en células. La tendencia se observó con otro tipo de células.

10 A continuación, se realizaron ensayos de inhibición de migración e inhibición de invasión para evaluar la correlación con el hallazgo mencionado anteriormente. El resultado sugería que los anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2, preferentemente anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2, o anticuerpos aislados que reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2 pero no reconocen un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2, y lo más preferentemente los anticuerpos FA19-1, FA17-9, y 6AA_17-2, en particular FA19-1, tienen actividad inhibitoria de migración y actividad inhibitoria de invasión, y por lo tanto tienen el efecto de inhibir la metástasis *in vivo*.

20 Además, como se describe a continuación en los Ejemplos, los presentes inventores realizaron estudios y como resultado identificaron de forma satisfactoria epítomos reconocidos por anticuerpos que se obtienen como anticuerpos anti-CLCP1 humanos.

25 Los anticuerpos de la presente invención que reconocen epítomos en el dominio extracelular de CLCP1 humano que se describen a continuación se podrían caracterizar adicionalmente basándose en este resultado. En el presente documento, cuando dos anticuerpos reconocen un epítomo idéntico, esto se refiere a que los anticuerpos compiten y la unión de un anticuerpo biotinilado se inhibe con el otro anticuerpo en un experimento de competición con FCM.

30 Se encontró que los clones de anticuerpo obtenidos de forma satisfactoria en la presente invención se agrupaban en siete tipos dependiendo del tipo de epítomo de reconocimiento.

35 De forma específica, tales anticuerpos son anticuerpos aislados que reconocen el epítomo A en una región que contiene el dominio de FA58C: (1) epítomo localizado en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2 (en lo sucesivo en el presente documento abreviado como "aa 456 - aa 470").

40 Tales anticuerpos incluyen, por ejemplo, (2) un anticuerpo aislado (el primer anticuerpo) que reconoce un epítomo en una secuencia parcial (aa 461 - aa 470 en la SEQ ID NO: 2) de la secuencia de aminoácidos del antígeno CLCP1 humano. El primer anticuerpo incluye (corresponde a) los clones FA17-9 y FA19-1 de anticuerpo que se ha demostrado que inhiben la metástasis de forma eficaz, en particular, la metástasis de pulmón. El primer anticuerpo reconoce el mismo epítomo que el clon FA17-9 del anticuerpo, es decir, "anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11", o el mismo epítomo que el clon FA19-1 del anticuerpo, es decir, "anticuerpo que comprende la región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20". Dado que el epítomo reconocido por el primer anticuerpo es idéntico al epítomo reconocido por los clones FA17-9 y FA19-1 del anticuerpo, la competición se confirma cuando un anticuerpo de ensayo se añade al CLCP1 humano en la reacción como el primer anticuerpo y el clon FA17-9 o FA19-1 del anticuerpo. Por lo tanto, la competencia del primer anticuerpo se puede evaluar mediante experimentos de competición con FCM usando el clon FA17-9 o FA19-1 del anticuerpo, que es particularmente preferente usando FA19-1 (véanse los Ejemplos).

50 La competencia del primer anticuerpo también se puede evaluar basándose en la reactividad cruzada entre péptidos parciales. La competencia se puede someter a ensayo evaluando si un anticuerpo aislado se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2, pero no se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2.

60 En la presente invención se seleccionaron varios clones de anticuerpo, pero se identificó que los anticuerpos que reconocen el epítomo A se seleccionaban de forma repetida. Como resultado del examen de la razón de este fenómeno, se puede concebir que la antigenicidad del epítomo A sea extremadamente elevada y que se produzca superposición de epítomos.

Los primeros anticuerpos que reconocen el epítomo A incluyen los anticuerpos monoclonales FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA12-3, FA14-9, y FA20-3, así como FA17-9 y FA19-1.

65 (1) Se demostró que el segundo anticuerpo que reconoce un epítomo en aa 456 - aa 470 de la SEQ ID NO: 2 y el epítomo A en una región que contiene el dominio FA58C inhibía la metástasis de forma eficaz, y corresponde a un

anticuerpo aislado (3) que reconoce un epítipo en aa 456 - aa 465 de la SEQ ID NO: 2. Dado que el segundo anticuerpo reconoce un epítipo que es idéntico al epítipo reconocido por el clon 6AA_17-2 o 2AA_62-4 del anticuerpo, la competencia se confirma cuando se añade un anticuerpo de ensayo al CLCP1 humano en la reacción al mismo tiempo que el segundo anticuerpo y el clon 6AA_17-2 o 2AA_62-4 del anticuerpo. La competencia del segundo anticuerpo se puede confirmar como un anticuerpo competitivo mediante excrementos de competición con el clon 2AA_62-4 o 6AA_17-2 del anticuerpo que es particularmente preferente. La competencia del segundo anticuerpo también se puede evaluar basándose en la reactividad cruzada entre péptidos parciales. La competencia se puede confirmar mediante la evaluación de si un compuesto aislado se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2, pero no se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2.

Por otro lado, como resultado del análisis de las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos, los presentes inventores identificaron de forma satisfactoria no solamente las secuencias de aminoácidos de las respectivas regiones determinantes de la complementariedad de la región variable de cadena pesada (VH CDR1, VH CDR2, y VH CDR3) y las respectivas regiones determinantes de la complementariedad de la región variable de cadena ligera (VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3) sino también las secuencias de aminoácidos toda la región variable de cadena pesada (VH) y toda la región variable de cadena ligera (VL). Cada secuencia de aminoácidos identificada se describe a continuación.

Anticuerpo 1: FA17-9

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56;
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13;
- (7) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 5); y
- (8) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 10);

Anticuerpo 2: FA19-1

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57;
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22;
- (7) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 14); y
- (8) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 19); y

Anticuerpo 3: 6AA_17-2

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66;
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67;
- (7) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 58); y
- (8) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 (la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos es la SEQ ID NO: 63).

Los anticuerpos de la presente invención se pueden caracterizar adicionalmente basándose en el resultado que se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la presente invención está especificado por las respectivas secuencias de CDR. Por ejemplo, tales anticuerpos son anticuerpos aislados que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano, en el que las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de la complementariedad (VH CDR1, VH CDR2, VH CDR3, VL CDR1, VL CDR2, y VL CDR3) se seleccionan de (A) a (C) que siguen a continuación:

(A)

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(B)

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(C)

- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma.

Las secuencias de las regiones marco conservadas (FR) en las regiones variables de un anticuerpo de la presente invención no están limitadas en particular, siempre y cuando no influyan sustancialmente en la actividad de unión específica con respecto a un antígeno CLCP1 humano.

Por ejemplo, cuando un anticuerpo de la presente invención se construye como un anticuerpo humanizado, es posible usar las FR de anticuerpos humanos conocidos.

En otra realización, un anticuerpo de la presente invención se especifica mediante secuencias de VH y VL. Por ejemplo, tales anticuerpos son anticuerpos aislados que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano, en el que las secuencias de aminoácidos de las regiones variables (VH y VL) se seleccionan de (A) a (C) que siguen a continuación:

(A)

- (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y
- (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(B)

(1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o 15, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y

(2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o 20, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

5

(C)

(1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; y

10 (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma.

15 Los anticuerpos de la presente divulgación pueden tener regiones constantes además de las regiones variables (por ejemplo, en el caso de anticuerpo de tipo IgG o similares). Las secuencias de las regiones constantes no están limitadas en particular. Por ejemplo, cuando los anticuerpos de la presente invención se construyen como un anticuerpo humanizado, es posible usar regiones constantes de anticuerpos humanos conocidos como se describe a continuación

15

20 Los anticuerpos de la presente invención que se han descrito anteriormente se pueden preparar mediante métodos inmunológicos convencionales u otros métodos tales como métodos de presentación de fagos.

20

25 Los anticuerpos policlonales se pueden preparar usando un método inmunológico de acuerdo con el siguiente procedimiento. Se prepara un antígeno (CLCP1 o una porción del mismo), y los animales tales como conejos se inmunizan con este antígeno. El antígeno puede ser CLCP1 humano o CLCP1 de animales no humanos tales como CLCP1 de ratón. Tal CLCP1 se puede obtener a partir de muestras biológicas mediante purificación. Como alternativa, es posible usar CLCP1 recombinante. El CLCP1 humano recombinante se puede preparar, por ejemplo, por introducción de un gen que codifica CLCP1 (o una porción del mismo) en células hospedadoras usando un vector apropiado, y expresando el gen en las células recombinantes preparadas.

25

30 Como se ha descrito anteriormente, el dominio extracelular de CLCP1 (SEQ ID NO: 3) (o una porción del mismo), preferentemente una región que contiene el dominio FA58C (SEQ ID NO: 4) se expresa como una proteína de fusión con GST, β -galactosidasa, proteína de unión a maltosa, o etiqueta de histidina (His), o similares y también se puede usar como un antígeno para aumentar la inducción de inmunidad. Tales proteínas de fusión se pueden purificar fácilmente con métodos convencionales.

30

35

La inmunización se puede repetir, si fuera necesario. Después de que la titulación del anticuerpo sea suficientemente elevada, la sangre se recoge y el suero se obtiene mediante centrifugación o similar. El anticuerpo policlonal se prepara a partir del antisuero mediante purificación por afinidad.

40

40 Por otro lado, los anticuerpos monoclonales se pueden preparar mediante el siguiente procedimiento. En primer lugar, la inmunización se realiza con el mismo método como se ha descrito anteriormente. La inmunización se puede repetir, si fuera necesario. Después de que la titulación del anticuerpo sea suficientemente elevada, las células que producen anticuerpos se aíslan de los animales inmunizados. A continuación, las células que cruzan anticuerpos preparadas se fusionan con células de mieloma para dar hibridomas. Se seleccionan clones que producen anticuerpos altamente específicos para una proteína de interés. Después de clonar los hibridomas de forma individual, los anticuerpos de interés se purifican a partir de medios de cultivo de los clones seleccionados. Como alternativa, después de que las células de hibridoma se hayan expandido hasta que alcanzan un número deseado o superior, las células se puede trasplantar en cavidades peritoneales de animales (por ejemplo, ratones) y a continuación las células se cultivan como ascitis. El anticuerpo de intereses de purificar a partir de la ascitis. La cromatografía por afinidad usando proteína G, proteína A, o similares se puede usar preferentemente para purificar el anticuerpo partir de los medios de cultivo o ascitis se puede usar cromatografía por afinidad de antígeno inmovilizado. Además, es posible usar cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, fraccionamiento con sulfato de amonio, centrifugación y similares. Estos métodos pueden usar solos o en cualquier combinación de los mismos.

45

50

55

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos humanizados. En el presente documento, "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo cuya estructura es similar a la de un anticuerpo humano. Padres anticuerpos humanizados incluyen: anticuerpos quiméricos humanizados que resultan de la sustitución de las regiones constantes del anticuerpo con las de un anticuerpo humano; y anticuerpos de tipo humano injertados con CDR cuyas regiones constantes y variable excluyendo las regiones determinantes de la complementaridad (CDR) están sustituidas con las de un anticuerpo humano (P. T. Johans *et al.*, Nature (1986) 321: 522). Se han desarrollado métodos de mejora para aumentar la actividad de unión al antígeno de un anticuerpo de tipo humano injertado con CDR, que incluyen: métodos para seleccionar las FR de anticuerpo humano que es altamente homólogo con el anticuerpo de ratón, métodos para producir anticuerpos humanizados altamente homólogos, y métodos para sustituir aminoácidos en FR después de injertar las CDRs de ratón en anticuerpos humanos (véanse los documentos de Patente de Estados Unidos N.ºs 5585089, 5693761, 5693762, y 6180370; documentos de EP N.ºs 451216 y 682040;

60

65

documento de Patente japonesa N.º 2828340). Tales métodos se pueden usar para preparar anticuerpos de tipo humano de la presente invención.

Los anticuerpos quiméricos de tipo humano se pueden producir, por ejemplo, por sustitución de una región constante de anticuerpo humano para la región constante de un anticuerpo que se ha descrito anteriormente que tiene la estructura de una región variable de cadena H y/o la estructura de la región variable de cadena L descritas anteriormente. Tales regiones constantes de anticuerpo humano incluyen regiones constantes de anticuerpo humano conocidas. Un método para producir anticuerpos quiméricos de tipo humano se describe a continuación como un ejemplo.

En primer lugar, el ARNm se extrae de hibridomas que producen un anticuerpo de ratón de la presente invención. El ADNc se sintetiza a partir del ARNm mediante un método convencional. El ADNc sintetizado se inserta en un vector para construir una biblioteca de ADNc. Un vector que porta genes de cadena H y de cadena L se selecciona entre la biblioteca de ADNc usando fragmentos de genes de cadena H y de genes de cadena L como una sonda. Las secuencias de los genes de la región variable de cadena H y de la región variable de cadena L se determinan mediante secuenciación del inserto en el vector seleccionado. El ADN que codifica la región variable de cadena H se construye basándose en los datos de la secuencia obtenidos como se ha descrito anteriormente mediante síntesis química, escisión/ligación bioquímica, o similares. El ADN resultante que codifica la región variable de cadena H se liga con un ADN que codifica la región constante de cadena H humana, y a continuación se inserta en un vector de expresión para construir un vector de expresión para la cadena H. Tales vectores de expresión incluyen, por ejemplo, vectores basados en el virus SV40, vectores basados en el virus EB, y vectores basados en el virus del papiloma (BPV), pero no se limitan a los mismos. Además, los vectores de expresión para la cadena L se construyen con el mismo método. Las células hospedadoras se cotransforman con los vectores de expresión de cadena H y vectores de expresión de cadena L. Las células hospedadoras preferentes incluyen células CHO (ovario de hámster chino) (A. Wright y S. L. Morrison, *J. Immunol.* 160, 3393-3402 (1998)) y células SP2/0 (mieloma de ratón) (K. Motmans *et al.*, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 512-519 (1996); R. P. Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50, 1495-1502 (1990)). La transformación se puede realizar preferentemente usando electroporación, un método de lipofectina (R. W. Malone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6077 (1989); P. L. Felgner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413 (1987)), método de fosfato cálcico (F. L. Graham y A. J. van der Eb, *Virology* 52, 456-467 (1973)), método de DEAE-Dextrano, y similares.

Los transformantes se cultivan, y a continuación los anticuerpos quiméricos de tipo humano se aíslan de los transformantes o medios de cultivo. Los anticuerpos se pueden aislar o purificar mediante una combinación apropiada de métodos tales como centrifugación, fraccionamiento de sulfato de amonio, precipitación de proteínas por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración en gel.

Por otro lado, se pueden producir anticuerpos injertados con CDR de tipo humano, por ejemplo, con el siguiente método. En primer lugar, las secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena H y de cadena L de un anticuerpo anti-CLCP1 humano de ratón, y secuencias de nucleótidos que los codifican se determinan con los métodos para producir anticuerpos quiméricos como se ha descrito anteriormente. También se determinan las secuencias de aminoácidos de cada CDR.

A continuación, se seleccionan regiones marco conservadas (FR) que se intercalan con las CDR. Para seleccionar las FR están disponibles tres métodos. El primer método usa armazones de anticuerpo humano con estructuras tridimensionales conocidas, tales como NEWM y REI (Riechmann L. *et al.*, *Nature* 332, 323-327 (1988); Tempst, PR. *et al.*, *Protein Engineering* 7, 1501-1507 (1994); Ellis JH. *et al.*, *J. Immunol* 155, 925-937 (1995)). El segundo método usa las FR de una región variable de anticuerpo humano que es más homóloga a una región variable de anticuerpo de ratón de interés, en la que la región variable de anticuerpo humano se selecciona entre bases de datos (Queen C. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033 (1989); Rozak MJ. *et al.*, *J Biol Chem* 271, 22611-22618 (1996); Shearman CW *et al.*, *J. Immunol* 147, 4366-4373 (1991)). En el tercer método, se seleccionan aminoácidos mas comúnmente compartidos por las FR de anticuerpo humano (Sato K. *et al.*, *Mol Immunol* 31, 371-381 (1994); Kobinger F. *et al.*, *Protein Engineering* 6, 971-980 (1993); Kettleborough CA. *et al.*, *Protein Engineering* 4, 773-783 (1991)). Todos estos métodos se pueden usar en la presente invención.

Además, las secuencias de aminoácidos de FR a usar también incluyen secuencias de aminoácidos resultantes de la modificación de la secuencia de aminoácidos de una FR humana seleccionada, siempre y cuando el anticuerpo injertado con CDR de tipo humano producido a partir del mismo tenga la actividad de unirse de forma específica al CLCP1 humano. En particular, cuando una porción de la secuencia de aminoácidos de una FR humana seleccionada se reemplaza con la secuencia de aminoácidos de una FR del anticuerpo al partir del que se obtiene la CDR, es muy probable que el anticuerpo resultante retenga las propiedades del anticuerpo. El número de aminoácidos a modificar es preferentemente un 30 % o inferior en una FR completa, más preferentemente un 20 % o inferior en una FR completa, y aún más preferentemente un 10 % o inferior en una FR completa.

A continuación, los ADN que codifican regiones variables de cadena H y de cadena L se diseñan por combinación de las CDR que se han descrito anteriormente con las FR seleccionadas mediante uno cualquiera de los métodos que

se han descrito anteriormente. Basándose en este diseño, los ADN que codifican regiones variables de cadena H y los ADN que codifican regiones variables de cadena L se preparan mediante síntesis química, escisión/ligación bioquímica, o similares. A continuación, se construye un vector de expresión de cadena H mediante inserción, en un vector de expresión, del ADN que codifica la región variable de cadena H, junto con un ADN que codifica una región constante de cadena H de inmunoglobulina humana. De forma análoga, se construye un vector de expresión de cadena L mediante inserción, en un vector de expresión, del ADN que codifica la región variable de cadena L, junto con un ADN que codifica una región constante de cadena L de inmunoglobulina humana. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, vectores basados en el virus SV40, vectores basados en el virus EB, y vectores basados en el virus del papiloma (BPV), pero no se limitan a los mismos.

Las células hospedadoras se cotransforman con los vectores de expresión de cadena H y los vectores de expresión de cadena L preparados con el método que se ha descrito anteriormente. Tales células hospedadoras preferentes incluyen células CHO (ovario de hámster chino) (A. Wright y S. L. Morrison, *J. Immunol.* 160, 3393-3402 (1998)) y células SP2/0 (mieloma de ratón) (K. Motmans *et al.*, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 512-519 (1996); R. P. Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 50, 1495-1502 (1990)). La transformación se puede realizar preferentemente usando electroporación, un método de lipofectina (R. W. Malone *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 6077 (1989); P. L. Feigner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 7413 (1987)), método de fosfato cálcico (F. L. Graham y A. J. van der Eb, *Virology* 52, 456-467 (1973)), método de DEAE-Dextrano, y similares.

Los transformantes se cultivan, y a continuación los anticuerpos injertados con CDR de tipo humano se aíslan de los transformantes o medios de cultivo. Los anticuerpos se pueden aislar o purificar mediante una combinación apropiada de métodos tales como centrifugación, fraccionamiento de sulfato de amonio, precipitación de proteínas por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración en gel.

Los anticuerpos de la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpos funcionales tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, diacuerpos, y sc(Fv)₂. Los multímeros (por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, y polímeros) de tal fragmento de anticuerpo funcional también están incluidos en los anticuerpos de la presente invención.

Fab es un fragmento con un peso molecular de aproximadamente 50.000 que consiste en regiones variables de cadena L y cadena H, y un fragmento de cadena H que contiene el dominio C_{H1} y una porción de la región bisagra. Fab se obtiene por digestión de IgG con papaína en presencia de cisteína. En la presente invención, un anticuerpo descrito anteriormente se puede digerir con papaína to para preparar un Fab de este tipo. Como alternativa, un ADN que codifica una porción de la cadena H y de la cadena L de un anticuerpo que se ha descrito anteriormente se inserta en un vector apropiado. Fab se puede preparar a partir de transformantes por transformación usando el vector.

Fab' es un fragmento con un peso molecular de aproximadamente 50.000 obtenido por escisión del enlace disulfuro entre las cadenas H del F(ab')₂ que se describe a continuación. En la presente invención, el F(ab')₂ de este tipo se puede obtener tratando un anticuerpo que se ha descrito anteriormente mediante digestión con pepsina, seguido de escisión del enlace disulfuro con un agente reductor. Como alternativa, del mismo modo se pueden preparar Fab, Fab' mediante ingeniería genética usando ADN que codifica Fab'.

F(ab')₂ es un fragmento con un peso molecular de aproximadamente 100.000 obtenido por digestión de IgG con pepsina. F(ab')₂ está constituido por dos fragmentos (Fab') unidos en conjunto a través de enlace disulfuro, cada uno de los cuales consistiendo en regiones variables de cadena L y de cadena H, y un fragmento de cadena H que contiene el dominio C_{H1} y una porción de la región bisagra. En la presente invención, F(ab')₂ se puede preparar mediante digestión de un anticuerpo descrito anteriormente con pepsina. Como alternativa, Fab, F(ab')₂ se pueden preparar del mismo modo mediante ingeniería genética usando los ADN que codifican F(ab')₂.

Fv se puede preparar por digestión de un anticuerpo en fragmentos de anticuerpo con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina. Como alternativa, se construyen genes que codifican fragmentos de anticuerpo y se insertan en un vector de expresión. Fv se puede expresar en células hospedadoras apropiadas usando el vector (véase, por ejemplo, Co, M.S. *et al.*, *J. Immunol.* 152, 2968-2976 (1994); Better, M. y Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* 178, 476-496 (1989); Plueckthun, A. y Skerra, A. *Methods in Enzymology* 178, 476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* 121, 652-663 (1989); Rousseaux, J. *et al.*, *Methods in Enzymology* 121, 663-669 (1989); Bird, R. E. *et al.*, *TIBTECH* 9, 132-137 (1991)).

scFv es un fragmento de anticuerpo de una sola cadena en el que el extremo C terminal de una cadena de Fv que consiste en regiones variables de cadena H y de cadena L está unido a través de un conector peptídico apropiado al extremo N terminal de la otra cadena de Fv. Tales conectores peptídicos incluyen, por ejemplo, flexible (GGGGS (SEQ ID NO: 23))₃. Por ejemplo, un ADN que codifica un anticuerpo de scFv se construyen usando los ADN que codifican la región variable de cadena H y la región variable de cadena L de un anticuerpo descrito anteriormente y un ADN que codifica un conector peptídico, y a continuación se inserta en un vector apropiado. Los transformantes se obtienen por transformación con el vector resultante. scFv se puede preparar a partir de los transformantes.

dsFv es un fragmento de Fv cuyas regiones variables de cadena H y de cadena L están esterilizadas con un enlace disulfuro formado por introducción de restos de Cys en posiciones apropiadas en las regiones variables de cadena H y de cadena L. En cada cadena, la posición en la que se va a introducir el resto de Cys se determina basándose en la conformación predicha mediante modelado molecular. In En la presente invención, por ejemplo, la conformación se predice a partir de las secuencias de aminoácidos de regiones variables de cadena H y de cadena L de un anticuerpo descrito anteriormente. Los ADN se construyen para codificar regiones variables de cadena H y de cadena L que se han introducido con mutaciones basándose en la predicción, e insertado en un vector apropiado. Los transformantes se obtienen por transformación con el vector resultante. dsFv se puede preparar a partir de los transformantes.

Además, se pueden preparar multímeros de los fragmentos de anticuerpo mediante unión de anticuerpos scFv, anticuerpos dsFv, y similares a través de conectores apropiados, o fusionándolos con estreptavidina. Los anticuerpos de fusión o anticuerpos etiquetados se pueden preparar a partir de los anticuerpos (incluyendo fragmentos de anticuerpo) de la presente invención mediante fusión o unión de los anticuerpos con compuestos de bajo peso molecular, proteínas, sustancia de etiquetado, o similares. Tales sustancias de etiquetado incluyen sustancias radiactivas tales como ¹²⁵I.

Diacuerpo se refiere a un fragmento de anticuerpo divalente construido mediante fusión genética (Holliger P *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993); documento EP 404.097; documento WO 93/11161). Los diacuerpos son dímeros que consisten en dos cadenas polipeptídicas, en los que cada cadena polipeptídica tiene un VL y un VH unidos a través de un conector lo suficientemente corto como para prevenir la interacción de estos dos dominios, por ejemplo, un conector de aproximadamente cinco restos. El VL y el VH unidos en conjunto en una sola cadena polipeptídica formarán un dímero porque el conector entre ellos es demasiado corto como para formar un fragmento de región variable de una sola cadena. Como resultado, las cadenas polipeptídicas forman un dímero, y por lo tanto el diacuerpo tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos se pueden preparar por tratamiento de un anticuerpo con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para generar fragmentos de anticuerpo, o mediante construcción de ADN que codifican esos fragmentos de anticuerpo e introduciéndolos en vectores de expresión, seguido de expresión en una célula hospedadora apropiada (véase, por ejemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. 152, 2968-2976 (1994); Better, M. y Horwitz, A. H., Methods Enzymol. 178, 476-496 (1989); Pluckthun, A. y Skerra, A., Methods Enzymol. 178, 497-515 (1989); Lamoyi, E., Methods Enzymol. 121, 652-663 (1986); Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. 121, 663-669 (1986); Bird, R. E. y Walker, B. W, Trends Biotechnol. 9, 132-137 (1991)).

sc(Fv)₂ es un minicuerpo de una sola cadena producido por unión de dos VH a dos VL usando conectores y similares (Hudson *et al.*, J Immunol. Methods 231: 177-189 (1999)). sc(Fv)₂ se puede producir, por ejemplo, por unión de los scFVs a través de un conector.

Cuando se usa el efecto citotóxico de la presente invención, se usan anticuerpos unidos con regiones constantes. Los anticuerpos de la presente invención incluyen los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. El isotipo del anticuerpo se determina con la estructura de la región constante. Las regiones constantes de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4 se denominan C γ 1, C γ 2, C γ 3, y C γ 4, respectivamente. Aunque el efecto puede variar en un nivel u otro, es posible usar cualquiera de las regiones constantes en realizaciones que usen el efecto citotóxico de la presente invención. En términos del efecto citotóxico, una región constante preferente es la de IgG1.

(Moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo anti-CLCP1 humano o una porción del mismo)

En otro aspecto, la presente invención se refiere moléculas de ácido nucleico que codifican un anticuerpo de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento también denominados "ácidos nucleicos de la presente invención").

Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden preparar con métodos convencionales tales como síntesis química y escisión/ligación bioquímica. Los ácidos nucleicos de la presente invención se usan para preparar anticuerpos de la presente invención, pero no se limitan a los mismos.

(Vectores)

En otro aspecto, la presente invención se refiere a vectores que portan ácidos nucleicos de la presente invención en una manera expresable (en lo sucesivo en el presente documento también denominados "vectores de la presente invención") y células transformadas con los vectores (en lo sucesivo en el presente documento también denominadas "células transformadas de la presente invención"). Los vectores de expresión que se usan para expresar anticuerpos de la presente invención en células hospedadoras se pueden preparar por inserción de un ácido nucleico o un ácido nucleico que se une con una secuencia señal conocida por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, un ácido nucleico que se describe en los Ejemplos) en un vector apropiado. Cualquier vector se puede usar siempre y cuando el vector pueda portar un ácido nucleico de la presente invención en una manera expresable y pueda expresar el ácido nucleico en células hospedadoras. Los ácidos nucleicos de la presente invención se pueden insertar en vectores mediante métodos convencionales tales como métodos que usan enzimas de restricción y ADN ligasa (Molecular Cloning, Tercera Edición, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New

York). Las células hospedadoras apropiadas se seleccionan dependiendo del tipo de vector que se va a usar. Las células hospedadoras incluyen, por ejemplo, bacterias tales como *Escherichia coli*; levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*; y células animales tales como células COS y CHO.

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos para producir anticuerpos de la presente invención, que comprenden las etapas de:

- (a) cultivar células transformadas de la presente invención; y
- (b) aislar/purificar un anticuerpo como el producto de expresión.

10 Los anticuerpos de la presente invención se pueden expresar en células transformadas por su medio de cultivo cultivando las células transformadas preparadas mediante transformación de células hospedadoras con un vector que porta el ácido nucleico de la presente invención. A continuación, los anticuerpos de la presente invención se pueden preparar por aislamiento/ purificación del producto de expresión. La purificación/aislamiento se consigue mediante una combinación apropiada de métodos tales como centrifugación, fraccionamiento con sulfato de amonio, precipitación de proteínas por adición de sal, ultrafiltración, cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de filtración en gel.

(Composiciones farmacéuticas)

20 En otro aspecto, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos de la presente invención y vehículos farmacéuticamente aceptables.

(Formulaciones que comprenden anticuerpos y uso de los mismos)

25 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona agentes farmacéuticos que comprenden anticuerpos farmacéuticos de la presente invención para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1, métodos terapéuticos o preventivos que usan los agentes, agentes para inhibir la migración, invasión, metástasis, o crecimiento de células cancerosas que expresan CLCP1, y agentes citotóxicos frente a células cancerosas que expresan CLCP1, y agentes farmacéuticos para tratar o prevenir tumor que expresa CLCP1.

La presente invención también proporciona:

- 35 (a) agentes para inhibir la migración de células cancerosas, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen una actividad de inhibición de la migración de células cancerosas que expresan CLCP1;
- (b) agentes para inhibir la invasión de células cancerosas, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular del antígeno de CLCP1 humano y que tienen una actividad de inhibición de la invasión de células cancerosas que expresan CLCP1;
- 40 (c) agentes para inhibir la metástasis de células cancerosas, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen una actividad de inhibición de la metástasis de células cancerosas que expresan CLCP1;
- (d) agentes para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen una actividad de inhibición del crecimiento de células cancerosas que expresan CLCP1;
- 45 (e) agentes citotóxicos frente a células cancerosas, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen citotoxicidad frente a células cancerosas que expresan CLCP1;
- (f) agentes para tratar o prevenir tumor, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen al menos una de las actividades seleccionadas entre inhibición, migración, invasión, metástasis, y crecimiento de células cancerosas que expresan CLCP1; y
- 50 (g) agentes para su uso en el tratamiento o prevención de cáncer, que comprenden anticuerpos que reconocen el dominio extracelular de antígeno de CLCP1 humano y que tienen al menos una de las actividades seleccionadas entre inhibición, migración, invasión, metástasis, y crecimiento de células cancerosas que expresan CLCP1, y actividad citotóxicos frente a células cancerosas que expresan CLCP1.

60 En el presente documento, el tipo de cáncer no está limitado en particular, siempre y cuando el cáncer exprese CLCP1. Los ejemplos de cáncer de este tipo incluyen de forma específica cáncer de pulmón y cáncer de ganglios linfáticos metastásico. Por otro lado, los agentes farmacéuticos para tratar o prevenir tales cánceres tienen al menos una actividad inhibitoria seleccionada entre las actividades de inhibición de la migración, invasión celular, metástasis y crecimiento celular, y/o actividad citotóxica. Los agentes se pueden administrar para prevenir la metástasis del cáncer.

65 El tipo y el origen de un anticuerpo anti-CLCP1 que se va a usar en formulaciones que comprenden anticuerpos no están limitados en particular, siempre y cuando tenga una actividad de unión específica a CLCP1. Los anticuerpos

anti-CLCP1 pueden ser anticuerpos policlonales, anticuerpos oligoclonales (mezclas de varias a varias decenas de anticuerpos) y anticuerpos monoclonales. Preferentemente, dichos anticuerpos policlonales o anticuerpos oligoclonales se expresan como un anticuerpo recombinante (anticuerpo humanizado o anticuerpo quimérico) mediante ingeniería genética usando genes de anticuerpo aislados a partir de hibridomas preparados a partir de animales inmunizados. Los anticuerpos expresados se pueden usar después de la purificación. Como alternativa, es posible usar anticuerpos humanos recombinantes que tengan regiones variables humanas completas preparados mediante el uso de tecnología de presentación de fagos o similares. Los anticuerpos anti-CLCP1 pueden ser fragmentos de anticuerpo tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, diacuerpo, y sc(Fv)₂, y recombinantes genéticos de los mismos. Los anticuerpos anti-CLCP1 se pueden preparar con los métodos que se han descrito anteriormente.

Los anticuerpos preparados con los métodos que se han descrito anteriormente se pueden alterar de diversas formas siempre y cuando mantengan una actividad de unión específica a CLCP1. Tales anticuerpos alterados se pueden usar en la presente invención.

Los agentes para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1 y agentes para inhibir la migración, invasión, metástasis, o crecimiento de células cancerosas que expresan CLCP1, que comprenden un anticuerpo de la presente invención, se pueden formular con métodos convencionales. Los agentes se pueden formular añadiendo otros compuestos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, vehículos, excipientes, agentes disgregantes, tampones, agentes emulgentes, agentes de suspensión, analgésicos, estabilizantes, conservantes, antisépticos y solución salina fisiológica). Los excipientes incluyen, por ejemplo, lactosa, almidón, sorbitol, D-manitol y sacarosa. Los agentes disgregantes incluyen, por ejemplo, almidón, carboximetil celulosa y carbonato cálcico. Los tampones incluyen, por ejemplo, fosfato, citrato y acetato. Los agentes emulgentes incluyen, por ejemplo, goma arábica, alginato sódico y tragacanto. Los agentes de suspensión incluyen, monoestearato de glicerilo, monostearato de aluminio, metil celulosa, carboximetil celulosa, hidroximetil celulosa y lauril sulfato sódico. Los analgésicos incluyen, por ejemplo, alcohol bencílico, clorobutanol y sorbitol. Los estabilizantes incluyen, por ejemplo, propilenglicol, sulfito de dietilino y ácido ascórbico. Los conservantes incluyen, por ejemplo, fenol, cloruro de benzalconio, alcohol bencílico, clorobutanol y metilparabeno. Los antisépticos incluyen, por ejemplo, cloruro de benzalconio, ácido paraoxibenzoico y clorobutanol.

La forma de dosificación cuando se formula no está limitada en particular. La forma de dosificación incluye, por ejemplo, comprimidos, polvos, gránulos ligeros, gránulos, cápsulas, jarabes, inyecciones, preparaciones externas y supositorios.

Además, la vía de administración de la preparación de la presente invención que se ha descrito anteriormente no está limitada en particular. De forma específica, la preparación de la presente invención que se ha descrito anteriormente se puede administrar por vía oral o por vía parenteral (inyección intravenosa, intraarterial, subcutánea, intramuscular, o intraperitoneal, o introducción directa en células diana) a sujetos (pacientes) dependiendo de la forma de dosificación.

La dosificación de una preparación de la presente invención y se ha descrito anteriormente varía dependiendo de los síntomas, edad, sexo, y peso del paciente y similares. Los expertos en la materia pueden seleccionar de forma adecuada una dosificación apropiada. Por ejemplo, cuando el sujeto es un adulto (peso corporal de aproximadamente 60 kg), la dosificación se puede seleccionar de modo que la cantidad de principio activo sea de aproximadamente 0,001 a 100.000 mg para cada administración. El programa de administración se puede determinar, por ejemplo, a partir de la administración de una a varias veces al día, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez a la semana, y una vez al mes. El programa de administración se puede determinar considerando el estado del paciente, duración de la eficacia y similares.

(Métodos inmunológicos)

En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos inmunológicos que comprenden las etapas de:

- (a) poner en contacto un anticuerpo de la presente invención con células o tejidos aislados; y
- (b) detectar la expresión de CLCP1 en las células o tejidos.

Los métodos inmunológicos incluyen, por ejemplo, método de tinción inmunohistoquímica, método de ELISA, radioinmunoensayo, FCM, métodos de inmunoprecipitación e inmunotransferencia. Por ejemplo, de los métodos inmunológicos mencionados anteriormente, un método de tinción inmunohistoquímica para detectar el nivel de expresión de CLCP1 en tejidos fisiológicos tales como células y tejidos se realiza con el procedimiento habitual de (1) a (10) que se describe en lo sucesivo en el presente documento.

Un método inmunológico de este tipo puede hacer referencia a un agente que comprende un anticuerpo de la presente invención para detectar el nivel de expresión de CLCP1 en células y tejidos con el método inmunológico. Además, el método inmunológico se puede usar, por ejemplo, en un método de diagnóstico para cáncer de pulmón, que se describe a continuación.

Las células o tejidos no están limitados en particular, e incluyen, por ejemplo, células cancerosas, tejidos cancerosos, y células o tejidos cancerosos potenciales.

(Agentes para detectar CLCP1 mediante técnicas inmunológicas)

5 En otro aspecto, la presente invención se refiere a agentes que comprenden un anticuerpo de la presente invención para detectar la expresión de CLCP1 en células o tejidos mediante una técnica inmunológica.

10 Los agentes pueden contener vehículos conocidos por los expertos en la materia. Los agentes se pueden usar, por ejemplo, en métodos para diagnóstico de cáncer de pulmón, como se describe a continuación.

(Kits)

15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a kits que comprenden un anticuerpo de la presente invención para detectar la expresión de CLCP1 en células o tejidos mediante una técnica inmunológica. De forma específica, los kits de este tipo se pueden producir por combinación de un anticuerpo de la presente invención con sustratos necesarios para detección de una etiqueta, un control positivo fuerte y un control negativo, tampones para lavar o diluir muestras, y así sucesivamente.

20 Los kits se pueden usar, por ejemplo, en métodos de diagnóstico para cáncer de pulmón, como se describe a continuación.

(Ensayo de diagnóstico de inmunotinción para evaluar el grado de invasión o metástasis de cáncer de pulmón humano)

25 Además, en otro aspecto, la presente invención proporciona métodos de diagnóstico para evaluar el sitio y grado de invasión de cáncer de pulmón (gravedad de la invasión), o estado y sitio metastásico basándose en la capacidad de tinción particularmente excelente del cáncer de pulmón con un anticuerpo de la presente invención (en lo sucesivo en el presente documento también denominados "métodos de diagnóstico de la presente invención"). Los métodos de diagnóstico de la presente invención comprenden la etapa de poner en contacto un anticuerpo de la presente invención con un tejido patológico aislado, y detectar la expresión de CLCP1 en un tejido patológico con un método inmunológico.

35 En el presente documento, "detectar la expresión de CLCP1" se refiere a determinar el nivel de expresión de CLCP1 por célula que expresa CLCP1, o la proporción de células que expresan CLCP1. Existe una fuerte correlación entre la expresión de CLCP1 y la posibilidad de que una célula sea cancerosa, o entre la expresión de CLCP1 y el grado de invasión del tejido por el cáncer o un sitio de metástasis de cáncer, en el que la expresión de CLCP1 también se puede presentar con intensidad de tinción o proporción de células cancerosas fuertemente teñidas determinado con un método inmunológico.

40 Los métodos de diagnóstico de la presente invención permiten la comprensión visual del sitio y estado de la metástasis o el patrón de aparición de células cancerosas que invaden nuevos tejidos.

45 Los métodos de diagnóstico de la presente invención se describen con más detalle a continuación. En primer lugar, los tejidos en los que se sospecha invasión de cáncer o metástasis se aíslan a partir de un organismo vivo.

La información obtenida (resultado de detección) obtenida con los métodos se usa para evaluar el grado de invasión o sitio de metástasis de células de cáncer de pulmón en tejidos patológicos.

50 En este contexto, como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación, una pluralidad de tejidos de cáncer de pulmón y carcinomas de pulmón, que eran diferentes en el grado de invasión, se tiñeron de forma inmunológica con un anticuerpo anti-CLCP1. Los patrones de tinción eran significativamente diferentes, y se encontró que las áreas intensamente teñidas eran coherentes con las áreas de cáncer determinadas de forma patológica. En consecuencia, hay una fuerte correlación entre el grado de invasión o metástasis de células de cáncer de pulmón y el nivel de expresión de CLCP1 o frecuencia de expresión de CLCP1 en células. Los métodos de diagnóstico de la presente invención permiten la comprensión visual del sitio y estado de metástasis o patrón de aparición de células cancerosas que invaden los nuevos tejidos. De forma específica, se reveló que CLCP1 era eficaz como un marcador para evaluar el grado de invasión de células de cáncer de pulmón.

60 Además, el nivel de expresión de CLCP1 es significativamente más elevado en el cáncer de pulmón que en el pulmón normal (intensidad de tinción o frecuencia de expresión celular en tejidos).

65 En otra realización, basándose en el hallazgo que se ha descrito anteriormente, la presente invención proporciona métodos para evaluar la malignidad en un tejido patológico usando el resultado de detección obtenido en la etapa mencionada anteriormente, específicamente métodos para evaluar la malignidad de células cancerosas.

Los resultados de protección obtenidos con los métodos de la presente invención son útiles para diagnosticar el cáncer. Por ejemplo, la información obtenida mediante el análisis de pacientes de cáncer usando un método descrito anteriormente se puede usar para controlar o evaluar la afección patológica del paciente o el efecto terapéutico. Por ejemplo, cuando el método de la presente invención se realiza paralelamente al tratamiento del cáncer, la información resultante se puede usar para evaluar el efecto terapéutico. De forma específica, el método de la presente invención se realiza para evaluar el cambio y la capacidad de tinción en tejidos patológicos después de la administración de agentes farmacéuticos. El efecto terapéutico se puede evaluar basándose en los cambios dependientes del tiempo en el grado de invasión o en el número de sitios de metástasis. Por lo tanto, los métodos de la presente invención se pueden usar para controlar los efectos terapéuticos.

Por otro lado, cuando el sujeto no es un paciente, sino una persona que aún no ha sido diagnosticada con cáncer, la información resultante se puede usar para evaluar o juzgar la presencia de una invasión o metástasis de cáncer. Se puede decir que los métodos de la presente invención son muy valiosos, ya que se pueden usar para diagnosticar el cáncer basándose en la capacidad de tinción que es un indicador altamente objetivo.

Cuando el sujeto (persona que está siendo examinada, individuo vivo, o paciente) es un ser humano, en general, el diagnóstico de cáncer se realiza por parte de médicos incluyendo las personas que son instruidas por médicos (lo mismo se aplica en lo sucesivo en el presente documento). Los datos con respecto al nivel de expresión de CLCP1 en tejidos patológicos, que se obtienen con los métodos diagnósticos de la presente invención, son útiles para expertos en medicina para diagnosticar los sujetos. Por lo tanto, los métodos de diagnóstico de la presente invención se pueden expresar como un método de recolección y suministro de datos que son útiles para los expertos en medicina para diagnosticar sujetos.

El tipo de cáncer como la diana de los métodos de diagnóstico de la presente invención no está limitado en particular; sin embargo, dicho cáncer incluye, por ejemplo, cáncer de riñón, tumor de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de mama, y cáncer de pulmón, de forma particularmente preferente cáncer de pulmón.

En lo sucesivo en el presente documento, la configuración de la presente invención se describe con detalle a continuación.

Las células se preparan a partir de sujetos (personas que se están sometiendo a ensayo o individuos vivos). Los sujetos pueden incluir personas sanas (incluyendo personas de las que se sospecha que tienen cáncer), así como pacientes con cáncer. En los métodos de la presente invención las porciones de órganos o tejidos recogidos de los sujetos por biopsia se pueden usar como células de cáncer de ensayo.

En el presente documento, el "tejido patológico" se refiere a un tejido que se usa como una muestra (diana) y detección con los métodos de la presente invención. Los tejidos patológicos de este tipo se aíslan de individuos vivos. De forma específica, la presente invención se aplica a los tejidos patológicos aislados de individuos vivos. "Aislado de un individuo vivo" se refiere a que las células cancerosas a someter a ensayo están completamente aisladas del individuo vivo a partir del que se originan las células por escisión de una porción de tejido biológico que contiene el tejido patológico.

Cuando se pone en contacto con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, en general, el tejido patológico se prepara en el mismo estado que en el individuo vivo, es decir, unido con células adyacentes (como un fragmento de tejido), y a continuación se somete a los métodos de la presente invención. Sin embargo, el tejido patológico en los métodos de la presente invención también se puede usar después de su separación (aislamiento) de las células circundantes. En el presente documento, "poner en contacto" se refiere a que el tejido de un cáncer o las células se empapan en una solución que contiene el anticuerpo, o la solución se hace gotear o se pulveriza suficientemente sobre el tejido o células de cáncer, y a continuación el tejido o células de cáncer se mantienen en condiciones fisiológicas que permiten que el anticuerpo reconozca CLCP1 en el tejido o células de cáncer.

Cuando el resultado de detección se usa para evaluar el grado de invasión o sitio de metástasis, los tejidos patológicos preferentes incluyen células que se consideran que van a ser células cancerosas con otros métodos de diagnóstico, células de las que se sospecha fuertemente que son células cancerosas y células que se supone que son células cancerosas potenciales, más preferentemente células que se considera que son células cancerosas con otros métodos de diagnóstico y células de las que se sospecha fuertemente que son células cancerosas. Tales otros métodos de diagnóstico incluyen, examen de contraste con rayos X, examen endoscópico, examen ultrasónico, examen de CT, examen de MRI, examen de PET y examen de diagnóstico usando marcadores tumorales. En general, las células cancerosas de ensayo se recogen a partir de tejidos de los que se sospecha que tienen cáncer con uno o más de los métodos de examen que se han descrito anteriormente.

A continuación, la detección de CLCP1 se realizó usando tejidos patológicos de ensayo preparados como dianas. "Detección de CLCP1" se refiere a evaluar si CLCP1 se expresa (presencia o ausencia de expresión), o determinar el nivel de expresión absoluta o relativa de CLCP1. El patrón del nivel relativo de expresión puede ser, por ejemplo, el nivel de CLCP1 en una muestra convencional preparada dependiendo del grado de invasión o sitio de metástasis.

En el presente documento, "muestra patrón" se refiere a una muestra que expresa CLCP1 que corresponde al grado de invasión de cáncer o sitio de metástasis de cáncer. Por ejemplo, un tejido patológico para el cual ya se ha determinado el grado de invasión de cáncer o sitio de metástasis de cáncer se puede usar como la muestra patrón de la presente invención. Como alternativa, los tejidos que no se ven afectados con cáncer se pueden usar como una muestra patrón en la presente invención.

En general, los tejidos patológicos se evalúan para la presencia de expresión de CLCP1, y, cuando se expresa CLCP1, el nivel de nivel de expresión se somete a ensayo. En la detección de CLCP1, la cuantificación precisa de CLCP1 no es esencial. Por ejemplo, cuando se detecta CLCP1 para evaluar el grado de invasión o sitio de metástasis en tejidos patológicos, se puede determinar el nivel de CLCP1 con una precisión tal que permita la evaluación del grado de invasión o sitio de metástasis en tejidos patológicos, por comparación del nivel de CLCP1 con respecto al de la muestra patrón como indicador del grado de invasión o sitio de metástasis.

De acuerdo con los métodos de diagnóstico de la presente invención, se diagnostica que un tejido patológico es potencialmente canceroso si una porción del tejido aislado se tiñe más intensamente que su área circundante.

El tipo de cáncer no está limitado en particular. Los cánceres de este tipo incluyen, por ejemplo, cáncer de riñón, tumor de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, y cáncer de mama, preferentemente cáncer de pulmón. Como se describe a continuación en los Ejemplos, las muestras de ensayo de tejido de cáncer de pulmón se inmunotifieron con un anticuerpo de la presente invención. El resultado demostró que la porción de cáncer de pulmón en las muestras de ensayo de tejido de cáncer de pulmón se teñía más intensamente que el área no cancerosa en las mismas muestras de ensayo.

En particular, CLCP1 se detecta preferentemente con métodos inmunológicos (por ejemplo, inmunohistoquímica, ELISA, radioinmunoensayo, FCM, inmunoprecipitación e inmunotransferencia). Un anticuerpo anti-CLCP1 se usa en tales métodos inmunológicos, y la proteína CLCP1 se detecta usando la actividad de unión del anticuerpo (la cantidad del anticuerpo unido) como un indicador. Tales métodos inmunológicos permiten una detección rápida y sensible. Además, los procedimientos de los métodos son sencillos.

Los métodos inmunohistoquímicos de este tipo permiten una detección rápida y sensible de CLCP1. Además, los procedimientos de los métodos son sencillos. Por lo tanto, los métodos inmunohistoquímicos reducen la carga de detección de CLCP1 para los sujetos (pacientes).

En la tinción inmunohistoquímica, en general, se realiza la primera etapa de puesta en contacto un tejido patológico de ensayo con un anticuerpo anti-CLCP1, y se determina la cantidad de anticuerpo anti-CLCP1 unido. De forma específica, el método de la presente invención se puede realizar de acuerdo con el método de tinción inmunohistoquímica que se describe a continuación.

En general, los tejidos biológicos se tiñen de forma inmunohistoquímica con el procedimiento que se describe a continuación en (1) a (10). Hay disponibilidad de diversos documentos y libros sobre tinción inmunohistoquímica de tejidos biológicos (por ejemplo, "Kousou Koutai Hou (Método de anticuerpo etiquetado con enzima) 3ª edición revisada", eds., Keiichi Watanabe y Kazuho Nakane, Gakusai Kikaku).

(1) Fijación y embebido en parafina

Los tejidos biológicos recogidos por vía quirúrgica de un organismo vivo se fijan en formalina, formaldehído, alcohol etílico anhidro, o similares. A continuación, los tejidos se embeben en parafina. En general, después de la deshidratación con alcohol, los tejidos se tratan con xileno, y por último se embeben en parafina. Las muestras embebidas en parafina se cortan en porciones en secciones de un grosor deseado (por ejemplo, de 3 a 5 µm) y se colocan sobre portaobjetos de vidrio. A veces, se usan muestras fijadas con alcohol, muestras secadas y montadas, las muestras congeladas y similares en lugar de muestras embebidas en parafina.

(2) Desparafinado

En general, las muestras se trataron con xileno, alcohol, y agua purificada en sucesión.

(3) Tratamiento previo (desenmascaramiento del antígeno)

Para desenmascarar antígenos, si fuera necesario, se realiza tratamiento enzimático, tratamiento térmico, tratamiento con presión, y/o similares.

(4) Bloqueo de peroxidasa endógena

Cuando se usa peroxidasa como sustancia de etiquetado en la tinción, la actividad de peroxidasa endógena se debería bloquear con antelación mediante el tratamiento con una solución de peróxido de hidrógeno.

(5) Bloqueo de la reacción no específica

Las secciones se tratan con una solución de albúmina de suero bovino (por ejemplo, solución al 1 %) durante varios minutos a varias decenas de minutos para inhibir la reacción no específica. Sin embargo, esta etapa se puede omitir cuando la reacción del anticuerpo primario se realiza usando una solución anticuerpo que contiene albúmina de suero bovino.

(6) Reacción primaria de anticuerpos

El anticuerpo se diluye a una concentración apropiada y se gotea sobre secciones sobre portaobjetos de vidrio. A continuación, las secciones se incuban de varias decenas de minutos a varias horas. Después de la incubación, las secciones se lavan con un tampón apropiado tal como tampón de fosfato.

(7) Adición de reactivo de etiquetado

La peroxidasa se usa comúnmente como una sustancia de etiquetado. Un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa se gotea en secciones sobre portaobjetos de vidrio. A continuación, las secciones se incuban de varias decenas de minutos a varias horas. Después de la incubación, las secciones se lavan con un tampón tal como tampón de fosfato.

(8) Reacción cromogénica

Se disuelve DAB (3,3'-diaminobenzidina) en tampón Tris, y a continuación se añade una solución de peróxido de hidrógeno. Se permite que la solución cromogénica resultante entre en las secciones durante varios minutos (por ejemplo, cinco minutos) para desarrollar el color. Después del desarrollo del color, las secciones se lavan suficientemente con agua para retirar la DAB.

(9) Tinción nuclear

La tinción nuclear se realiza haciendo reaccionar Hematoxilina de Mayer de varios segundos a varias decenas de segundos. Se permite que las secciones desarrollen color con lavado bajo agua corriente (generalmente, varios minutos).

(10) Deshidratación, aclarado y montaje

Después de deshidratar con alcohol y aclarar con xileno, las secciones se montan por último en resinas sintéticas, glicerina, jarabe de goma, o similares.

El tipo y fuente de un anticuerpo anti-CLCP1 que se va a usar en tinción inmunológica no están limitados en particular, siempre y cuando el anticuerpo tenga una actividad de unión específica a CLCP1. El anticuerpo anti-CLCP1 puede ser un anticuerpo monoclonal policlonal, oligoclonal (una mezcla de varios a varias decenas de anticuerpos). Dichos anticuerpos policlonales y oligoclonales pueden ser fracciones de IgG derivadas de antisueros obtenidos mediante inmunización de animales o anticuerpos que se purifican por afinidad usando el antígeno. Los anticuerpos anti-CLCP1 incluyen fragmentos de anticuerpo tales Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, diacuerpo, y sc(Fv)₂.

Los anticuerpos anti-CLCP1 se pueden preparar de acuerdo con los métodos que se han descrito anteriormente. Los anticuerpos preparados con los métodos descritos anteriormente se pueden modificar de forma diversa siempre y cuando conserven una actividad de unión específica a CLCP1. Tales anticuerpos modificados se pueden usar en la presente invención.

Cuando un anticuerpo etiquetado se usa como un anticuerpo anti-CLCP1, la cantidad de anticuerpo unido se puede determinar directamente usando la cantidad de la etiqueta como indicador. Un método de este tipo es más sencillo pero tiene problemas. La sensibilidad de detección del método por lo general es más baja, y es necesario preparar un anticuerpo anti-CLCP1 unido a una sustancia de etiquetado. Por lo tanto, de forma más preferente se usan métodos de detección indirecta, que usan un anticuerpo secundario unido a una sustancia de etiquetado y métodos que usan un polímero unido a un anticuerpo secundario y sustancia de etiquetado. El anticuerpo secundario se refiere a un anticuerpo que tiene la actividad de unirse de forma específica al anticuerpo anti-CLCP1. Por ejemplo, se puede usar un anticuerpo IgG anti-conejo cuando el anticuerpo anti-CLCP1 preparado es un anticuerpo de conejo. Los anticuerpos secundarios etiquetados que se pueden usar para detectar anticuerpos de diversas especies animales tales como conejo, cabra y ratón están disponibles en el mercado. Por lo tanto, los anticuerpos apropiados se pueden seleccionar y usar dependiendo del tipo de anticuerpo anti-CLCP1 de la presente invención.

Como sustancia de etiquetado se usa preferentemente uno cualquiera seleccionado entre peroxidasa, β-D-galactosidasa, microperoxidasa, peroxidasa de rábano picante (HRP), isotiocianato de fluoresceína (FITC), isotiocianato de Rodamina (RITC), fosfatasa alcalina, biotina y sustancias radiactivas. En particular, la detección de

alta sensibilidad se puede conseguir con métodos en los que se usa biotina como la sustancia de etiquetado se hace reaccionar en combinación con peroxidasa de avidina.

5 Los anticuerpos de la presente invención descritos anteriormente se pueden usar en el presente documento como un anticuerpo anti-CLCP1. De forma específica, por ejemplo, es posible usar anticuerpos que se hayan sido aislados por los presentes inventores de forma satisfactoria. Como se describe en los Ejemplos que siguen a continuación, de los anticuerpos aislados de forma satisfactoria, en particular, el anticuerpo FA19-1 y tales tipos de cánceres invasores o que producen metástasis diferentes y teñidos de manera inequívoca de una manera distinguible. Por lo tanto, los anticuerpos son particularmente valiosos cuando se usan en métodos para determinar el sitio de invasión o metástasis de las células cancerosas (por ejemplo, células de cáncer de pulmón).

15 Además, en otro aspecto, la presente invención también proporciona métodos para predecir el pronóstico de cáncer (en lo sucesivo en el presente documento, también denominados "métodos de diagnóstico para pronóstico de cáncer"). Se puede decir que los métodos de diagnóstico para pronóstico de cáncer de la presente invención son un método para recoger y proporcionar datos que son útiles para expertos en medicina para predecir el pronóstico.

20 El tipo de cáncer diana en los métodos de diagnóstico para pronóstico de cáncer de la presente invención no está limitado en particular; sin embargo, los cánceres de este tipo incluyen, por ejemplo, cáncer de riñón, tumor de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de páncreas, cáncer de estómago, cáncer de intestino grueso, cáncer de mama, y cáncer de pulmón, de forma particularmente preferente cáncer de pulmón.

25 Los métodos de diagnóstico para pronóstico de cáncer de la presente invención comprenden las etapas de poner en contacto un anticuerpo de la presente invención con un tejido patológico aislado y detectar la expresión de CLCP1 en un tejido patológico mediante un método inmunológico. Las etapas se han descrito con detalle anteriormente en los ejemplos de métodos de diagnóstico de la presente invención.

30 En los métodos de diagnóstico para pronóstico de cáncer de la presente invención, se predice que la tasa de supervivencia es inferior para el grupo de casos clínicos en los que los tejidos patológicos aislados son fuertemente positivos en la tinción histológica que para el grupo de casos clínicos en los que los tejidos patológicos aislados son débilmente positivos o negativos en la tinción histológica.

35 Por ejemplo, la tasa de supervivencia de Kaplan-Meier a un año (12 meses) después de cirugía es de un 73 % en el grupo de casos clínicos fuertemente positivos en la tinción histológica, mientras que la tasa es de un 93 % en el grupo de casos clínicos débilmente positivos o negativos. Por otro lado, la tasa de supervivencia a tres años (36 meses) después de cirugía es de un 55 % en el grupo de casos clínicos fuertemente positivos, mientras que la tasa es de un 90 % en el grupo de casos clínicos débilmente positivos o negativos.

40 La tinción histológica positiva fuerte se refiere a un resultado de tinción en el que la membrana celular está claramente teñida (el contorno de la membrana celular es visible al microscopio) en un tejido patológico aislado, como se muestra en el panel superior de la Fig. 37B. Por otro lado, la tinción histológica positiva débil se refiere a un resultado de tinción en el que la membrana celular solo se tiñe ligeramente (el contorno de la membrana celular es invisible al microscopio) en un tejido patológico aislado, como se muestra en el panel inferior de la Fig. 37B. Como alternativa, tinción histológica negativa se refiere a un resultado de tinción en el que la membrana celular es completamente invisible en un tejido patológico aislado.

45 Además, la presente invención proporciona agentes y kits que comprenden un anticuerpo de la presente invención para su uso en los métodos de diagnóstico que se han descrito anteriormente para pronóstico de cáncer.

50 (Método de cribado)

En otro aspecto, la presente invención se refiere a métodos de cribado para sustancias candidatas que inhiben el crecimiento, invasión, migración o metástasis de células cancerosas, o sustancias candidatas que tienen actividad citotóxica hacia células cancerosas, que comprenden las etapas de:

- 55
- (a) poner en contacto una sustancia de ensayo con el dominio extracelular de un antígeno de CLCP1 humano;
 - (b) detectar la unión entre una sustancia de ensayo y el dominio extracelular del antígeno de CLCP1 humano; y
 - (c) seleccionar una sustancia de ensayo que se une al dominio extracelular del antígeno de CLCP1 humano.

60 Las respectivas etapas se consiguen usando métodos o conocidos o métodos que se han descrito anteriormente.

65 Las sustancias candidatas en los métodos de cribado de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, proteínas purificadas (incluyendo anticuerpos), productos de expresión de bibliotecas genéticas, bibliotecas de péptidos sintéticos, bibliotecas de ADN o ARN (incluyendo ácidos nucleicos funcionales tales como aptámeros y ARNsi), extractos celulares, sobrenadantes de cultivo celular, y bibliotecas de compuestos sintéticos de bajo peso molecular.

Las sustancias de ensayo que se unen al dominio extracelular de un antígeno de CLCP1 humano, que se seleccionan con los métodos de cribado de la presente invención, son sustancias candidatas a agentes para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1, o agentes para inhibir el crecimiento, migración, invasión, o metástasis de células cancerosas, o sustancias candidatas que tienen actividad citotóxica hacia células cancerosas. De forma específica, la presente invención proporciona agentes para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1, agentes para inhibir el crecimiento, migración, invasión, o metástasis de células cancerosas, y agentes citotóxicos frente a células cancerosas, que comprenden, como un principio activo, una sustancia seleccionada para cribado de acuerdo con la presente invención. La presente invención también se refiere al uso de sustancias seleccionadas con los métodos de cribado de la presente invención, para producir agentes para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1, agentes para inhibir el crecimiento, migración, invasión, o metástasis de células cancerosas, o agentes citotóxicos frente a células cancerosas. Cuando una sustancia aislada con los métodos de cribado de la presente invención se usa como un agente para tratar o prevenir cáncer que expresa CLCP1, esta se puede formular usando métodos de producción farmacéutica conocidos. Por ejemplo, el agente se administra a pacientes en combinación con vehículos o medios farmacéuticamente aceptables (solución salina fisiológica, aceites vegetales, agentes de suspensión, tensioactivos, estabilizantes, etc.). El agente se administra por vía transdérmica, por vía nasal, por vía transbronquial, por vía intramuscular, por vía intravenosa, o por vía oral, de acuerdo con las propiedades de la sustancia. La dosis varía dependiendo de la edad del paciente, peso, síntomas, método de administración, etc.; sin embargo, los expertos en la materia pueden seleccionar de forma apropiada una dosis adecuada.

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá de forma más específica con referencia a los Ejemplos, pero no se debe interpretar que se limita a las realizaciones que se describen en los Ejemplos.

Ejemplos

[Ejemplo 1] Preparación de ADNc de CLCP1 humano

Se seleccionaron EST correspondientes a CLCP1 a partir de la base de datos de EST de NCBI. El extremo en la posición 3' se determina mediante 3'-RACE. La secuencia de ADNc de longitud completa de CLCP1 humano se determinó y se depositó en una base de datos (base de datos de GenBank, N.º de Registro AB073146; Koshikawa K, *et al.*, *Oncogene* 21: 2822-2828 (2002)). Los cebadores se diseñaron basándose en esta secuencia de ADNc de CLCP1 humano (base de datos de GenBank, N.º de Registro AB073146 (la misma secuencia que la de NM-080927)). El cebador 5'-CCCAAGCTT GCAGGCAGAC TGCCGGC-3' (SEQ ID NO: 25) se preparó basándose en la secuencia de nucleótidos de las posiciones 336 a 356 (5'-CTATGCAGGC AGACTGCCGG C-3' (SEQ ID NO: 24)) inmediatamente antes del primer nucleótido (posición 364) del ORF. Este cebador contiene una mutación de ATG a TTG (subrayada) para prevenir el inicio de la traducción a partir de ATG (subrayada) en un marco de lectura diferente. El cebador también tiene una secuencia de reconocimiento *HindIII* (AAGCTT) en el extremo en la posición 5'. El cebador 5'-CGAGGTACCAAGGATTTCTTTAAAAACATCA-CAT-3' (SEQ ID NO: 26) se preparó por adición de una secuencia de reconocimiento *KpnI* (GGTACC) al extremo en la posición 5' de una secuencia complementaria con la secuencia de nucleótidos de las posiciones 2664 a 2688 inmediatamente antes del codón de parada. El ARN se preparó a partir de tejido del pulmón normal usando el Kit RNAeasy (Qiagen), y a continuación se procesó mediante RT-PCR usando los cebadores que se han descrito anteriormente para amplificar ADNc de CLCP1 humano. El producto de PCR se clonó en un vector de clonación, pBSSKII (Stratagene), entre los sitios *HindIII* y *KpnI*. La secuencia de nucleótidos se determinó (aproximadamente 2362 pb incluyendo la secuencia adicional; región traducida de 2331 pb; 777 codones (*HindIII* -*KpnI* de CLCP1)) usando un secuenciador automático (Applied Biosystems). Después de la secuenciación, el CLCP1 se excindió con *HindIII* y *KpnI*, y a continuación se insertó en un vector pcDNA3-HA de expresión de proteína con etiqueta de HA (una donación del Dr. N. Inohara en el Departamento de Medicina, Universidad del Michigan) entre los sitios *HindIII* *KpnI*, proporcionando de ese modo un vector de expresión pcDNA3-CLCP1-HA para el CLCP1 de longitud completa unido a etiqueta de HA.

[Ejemplo 2] Preparación de células que expresan CLCP1 humano

El vector de expresión pQCXIPG de células animales se usó para expresar el CLCP1 humano de longitud completa (posiciones 1 a 775 del aminoácido) o el dominio extracelular completo del CLCP1 humano (posiciones 1 a 526 del aminoácido). pQCXIPG está bajo el control del promotor de CMV, y su secuencia IRES permite la expresión simultánea de una proteína de fusión de puromicina-EGFP y un gen de interés. Por otro lado, el vector de expresión en animal, lyssig-pQCXIPG, se usó para expresar el CLCP1 humano parcial que contenía el dominio FA58C humano (posiciones 284 a 526 de los aminoácidos) en células animales. La secuencia señal secretora de lisozima de clara de huevo de pollo [secuencia de aminoácidos: MRSLLILVLCFLPLAALG|AAA (SEQ ID NO: 27), secuencia genética:

ATGAGGTCTTTGCTAATCTTGGTGCTTTGCTTCTGCCCCTGGCTGCTCTGGGG|GCGG CCGCC (SEQ ID NO: 28), en la que "|" indica el límite entre la secuencia señal y la proteína estructural] se añade cadena arriba del sitio de multiclonación de pQCXIPG mencionada anteriormente. El vector lyssig-pQCXIPG se usa para permitir una secreción forzada del producto traducido del gen introducido hacia fuera de las células. Los presentes inventores construyeron los vectores pQCXIPG y lyssig-pQCXIPG a partir de modificación basándose en pQCXIP que es uno de los "Vectores BD Retro-XTM Q".

En cada caso, la amplificación de genes de interés por PCR se realizó con KOD-Plus-(TOYOBO) usando el pcDNA3-CLCP1-HA que se ha descrito anteriormente como un molde.

5 El CLCP1 humano de longitud completa se amplificó por PCR [34 ciclos de (99 °C durante 30 segundos, 61 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante dos minutos)] usando el cebador en la posición 5', 5'-AATAGCGGCCCGCACCATGGCGAGCCGGGCGGTG-3' (SEQ ID NO: 29; el sitio *NotI* está subrayado) y el cebador 3', 5'-ACGCGTCGACAAAGGATTTCTTTAAAAACATCACATTC-3' (SEQ ID NO: 30; el sitio *Sall* está subrayado). El dominio extracelular completo del CLCP1 humano se amplificó por PCR [34 ciclos de (99 °C durante 30 segundos, 61 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante dos minutos)] usando el cebador en la posición 5', 5'-AATAGCGGCCCGCACCATGGCGAGCCGGGCGGTG-3' (SEQ ID NO: 29; el sitio *NotI* está subrayado) y el cebador 3', 5'-ACGCGTCGACTTACATCTTTGGTTACATTTGGAG-3' (SEQ ID NO: 31 el sitio; *Sall* está subrayado). Ambos productos amplificados por PCR se difirieron con las enzimas de restricción *NotI* y *Sall*, y cada uno de los fragmentos resultantes se insertó en pQCXIPG entre los sitios *NotI* y *XhoI*. Esto proporcionó vectores de expresión, pQCXIPG-completo y pQCXIPG-EC. Por otro lado, el CLCP1 humano parcial que contenía el dominio FA58C se amplificó por PCR [34 ciclos de (99 °C durante 30 segundos, 61 °C durante 30 segundos, y 68 °C durante dos minutos)] usando el cebador en la posición 5', 5'-AATAGCGGCCCGCTCTTTTTACATTTAAGACAAGTGG-3' (SEQ ID NO: 32; el sitio *NotI* está subrayado) y el cebador 3', 5'-ACGCGTCGACAAAGGATTTCTTTAAAAACATCACATTC-3' (SEQ ID NO: 30; el sitio *Sall* está subrayado). El producto de PCR amplificado se difirió con las enzimas de restricción *NotI* y *Sall*, y a continuación se insertó en lysig-pQCXIPG entre los sitios *NotI* y *XhoI*. Esto proporcionó el vector de expresión pQCXIPG-FA.

El Sistema de Expresión Retroviral Pantrópico (Clontech; K1063-1) se usó para establecer líneas de células que expresan antígeno. GP2-293 (Clontech; K1063-1) cultivado a una confluencia de un 80 % a un 90 % en placas revestidas con colágeno de 100 mm se cotransfectó usando Lipofectamina 2000 con 11,2 µg cada uno de pVSV-G (Clontech; K1063-1) y se construyó un vector de expresión que se ha descrito anteriormente (pQCXIPG-completo, pQCXIPG-EC, o pQCXIPG-FA). Después de 48 horas, los sobrenadantes que contienen viriones se recogieron, y los viriones se precipitaron mediante ultracentrifugación (18.000 rpm, 1,5 h, 4 °C). Los precipitados se suspendieron en 30 µl de TNE (Tris-HCl 50 mM (pH 7,8), NaCl 130 mM, EDTA 1 mM) para preparar concentrados de vector retroviral.

Se diluyeron 5 µl de concentrado de vector retroviral con 150 µm de DMEM (SIGMA; D5796)/FBS al 10 % que contenía 8 µg/ml de bromuro de hexadimetrina (SIGMA; H-9268) para preparar un medio que contenía viriones. El medio de 293T, cultivado hasta una confluencia de aproximadamente un 40 % en micro placas de 96 pocillos, se reemplazó con el medio que contenía viriones preparado para introducir pQCXIPG-completo, pQCXIPG-EC, o pQCXIPG-FA. Después de transferencia genética, los cultivos se expandieron usando DMEM (SIGMA; D5796)/FBS al 10 % que contenía 5 µg/ml de Puromicina (SIGMA; P-8833) para establecer líneas de células que expresan antígeno (hCLCP1-completo/293T, hCLCP1-EC/293T, y hCLCP1-FA/293T).

[Ejemplo 3] Preparación de antígeno de inmunización

Las líneas celulares establecidas que se han descrito anteriormente (hCLCP1-EC/293T y hCLCP1-FA/293T) se cultivaron en DMEM/FBS al 10 % (5 µg/ml de puromicina) o CD293 (Invitrogen). Se recogió aproximadamente un litro de cada uno de los sobrenadantes, y las proteínas recombinantes unidas a etiqueta de myc-His se purificaron a partir de los mismos usando el Kit de Purificación TALON (Clontech; K1253-1) o una columna de afinidad rellena con vehículos químicamente modificados con un anticuerpo de etiqueta anti-myc. A continuación, las proteínas purificadas se dializaron frente a PBS, y se evaluaron por SDS-PAGE y transferencia del Western. Las concentraciones de proteína se determinaron usando el Kit II de Ensayo de Proteína (BioRad; 500-0002JA). Las muestras de proteína resultantes se usaron como antígenos de inmunización.

[Ejemplo 4] Inmunización de antígeno

La proteína purificada del dominio extracelular de CLCP1 humano o la proteína parcial purificada que contenía el dominio FA58C de CLCP1 humano se combinó con un volumen igual de adyuvante completo (SIGMA; F5881). Usando la emulsión resultante, los ratones BALB/c (hembra) se inmunizaron de 5 a 50 µg/cabeza varias veces de cada tres a siete días. De tres a cinco días después de la inmunización final, los linfocitos se recogieron a partir de los ratones, y se fusilaron con células de una línea P3U1 de mieloma de ratón (P3-X63Ag8U1).

[Ejemplo 5] Fusión celular, y selección y preparación de células que producen anticuerpos monoclonales

La fusión celular se realizó básicamente de acuerdo con el siguiente método convencional. En cada caso, el suero bovino fetal (FBS) a añadir al medio de cultivo se inactivó por calentamiento a 56 °C durante 30 minutos. Las células P3U1 se prepararon por cultivo en RPMI1640/FBS al 10 % (que contenía penicilina y estreptomycin).

Los linfocitos de ratón recogidos y las células P3U1 se mezclaron a una proporción de 10:1 a 2:1. Después de centrifugación, el polietilenglicol 4000 al 50 % (Merck; 1.09727.0100) como un agente de aumento de la fusión se añadió poco a poco a las células precipitadas a la vez que la mezcla se agitaba suavemente para conseguir la fusión

celular. A continuación, la mezcla se agitó suavemente a la vez que se añadía RPMI1640 a la misma poco a poco. La mezcla resultante se centrifugó, y las células fusionadas, precipitadas se diluyeron de forma apropiada con medio HAT [RPMI1640, suplemento de HAT (Invitrogen; 11067-030), penicilina y estreptomycin] suplementado con un 15 % de FBS, y se sembraron a 200 en microplacas de 96 pocillos.

5 Las células fusionadas se cultivaron en una incubadora de CO₂ (CO₂ al 5 %, 37 °C). Después de la formación de colonias suficientemente grandes, las células se cribaron mediante toma de muestras de los sobrenadantes del cultivo.

10 En este cribado, los hibridomas reactivos hacia 293T con expresión forzada del CLCP1 de longitud completa (hCLCP1-completo/293T) se seleccionaron mediante citometría de flujo a partir de las positivas en ELISA usando placas de 96 pocillos sensibilizadas con el mismo antígeno de CLCP1 usado en la inmunización. Después de expansión del cultivo en medio de HT [RPMI1640, suplemento de HT (Invitrogen; 21060-017), penicilina y estreptomycin] suplementado con un 15 % de FBS, las células se clonaron en clones individuales con el método de dilución limitante. Con el método que se ha descrito anteriormente se obtuvieron once clones de hibridoma que producen anticuerpo anti-CLCP1 humano. De los 11 clones, un clon (anticuerpo N.º EC6-8) se obtuvo usando, como un inmunógeno, la proteína completa de dominio extracelular (posiciones 1 a 526 del aminoácido), y 10 clones (anticuerpos N.ºs FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA10-3, FA12-3, FA14-9, FA16-3, FA17-9, FA19-1, y FA20-3) se obtuvieron usando la proteína parcial que contenía el dominio FA58C (posiciones 284 a 526 del aminoácido).

20 [Ejemplo 6] Reactividad del anticuerpo con respecto a células que expresan CLCP1 humano (FCM)

Los anticuerpos preparados como se ha descrito anteriormente se evaluaron para la reactividad con respecto a CLCP1 humano endógeno mediante el ensayo de su reactividad con respecto a células de la línea H460-LNM35 de alta expresión de CLCP1 de acuerdo con el método que sigue a continuación. El anticuerpo anti-CLCP1 humano se purificó a partir del sobrenadante de cultivo de cada clon de hibridoma mediante un método convencional de purificación por afinidad usando Proteína A-Sepharose. Los anticuerpos purificados se diluyeron cada uno a 5 µg/ml, y la intensidad de la reacción para H460-LNM35 se evaluó mediante citometría de flujo. En este ensayo, el anticuerpo monoclonal anti-CLCP1 unido a la superficie celular se detectó usando un anticuerpo de IgG anti-ratón etiqueta con ficoeritrina. Todas las muestras se procesaron en las mismas condiciones. Como se observa en la Fig. 2, el resultado mostraba que, excepto los clones de anticuerpo N.ºs FA10-3 y FA16-3, nueve clones (anticuerpos N.ºs EC6-8, FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA12-3, FA14-9, FA17-9, FA19-1 y FA20-3) eran reactivos. Por lo tanto, se demostró que los nueve clones eran reactivos a CLCP1 humano endógeno. En particular, se sugirió que tres clones, EC6-8, FA17-9 y FA19-1 eran altamente reactivos.

35 [Ejemplo 7] Análisis de epítipo reconocido por anticuerpos monoclonales (ensayo de inhibición usando anticuerpos biotinilados)

Los anticuerpos anti-CLCP1 humanos de nueve clones establecidos se biotinilaron mediante un método convencional. Un anticuerpo no etiqueta con se combinó a 2, 1, 0,5, o 0,25 µg/ml con un anticuerpo biotinilado a una concentración constante (1 µg/ml). Un experimento de inhibición se realizó incubando células de la línea H460-LNM35 en la mezcla de reacción y determinando la cantidad de anticuerpo biotinilado unido a la superficie celular por citometría de flujo usando StreptAvidin etiquetado con ficoeritrina. En este sistema experimental, cuando el epítipo reconocido por el anticuerpo biotinilado que se está sometiendo a ensayo está cerca del epítipo reconocido por el anticuerpo no etiquetado añadido, la unión del anticuerpo biotinilado se inhibe y como resultado la reacción se altera dependiendo de la concentración añadida del anticuerpo no etiquetado. El análisis de epítopos (formación de grupos de epítopos) se consiguió realizando este ensayo usando todas las combinaciones posibles de los anticuerpos monoclonales aislados. La Fig. 3 muestra un resultado de análisis en tres clones que presentan una reactividad significativamente más elevada. El eje vertical indica la cantidad de anticuerpo biotinilado unido (StreptAvidin etiquetado con ficoeritrina) (intensidad de fluorescencia media con, MFI), mientras que el eje horizontal indica la cantidad añadida de anticuerpo no etiquetado (µg/ml). El resultado en cada clon sugería que aparte de EC6-8, los ocho clones (anticuerpos N.ºs FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA12-3, FA14-9, FA17-9, FA19-1 y FA20-3) reconocían un epítipo adyacente.

55 [Ejemplo 8] Análisis del epítipo reconocido por el anticuerpo monoclonal EC6-8 (inmunoprecipitación)

El epítipo reconocido por EC6-8 solo es diferente de los otros en el experimento de inhibición descrito anteriormente usando anticuerpos biotinilados. Por lo tanto, la ubicación del epítipo distinto se analizó por inmunoprecipitación. Las proteínas diana usadas fueron la proteína del dominio extracelular completa (posiciones 1 a 526 del aminoácido) y la proteína parcial que contiene el dominio FA58C (posiciones 284 a 526 del aminoácido). Estas proteínas diana se hicieron reaccionar individualmente con Proteína G-Sepharose unida a EC6-8. Las muestras resultantes de inmunoprecipitación se sometieron a transferencia de Western pensando un anticuerpo de etiqueta anti-myc para detectar la unión de EC6-8 a las proteínas diana. Como se muestra en la Fig. 4, el resultado mostró que tanto la proteína del dominio extracelular completo (posiciones 1 a 526 del aminoácido) como la proteína parcial que contiene el dominio FA58C (posiciones 284 a 526 del aminoácido) se inmunoprecipitaron, lo que sugiere que el epítipo reconocido por EC6-8 está localizado dentro de la región de las posiciones 284 a 526 del aminoácido. La

Fig. 4 muestra también el resultado de la formación de grupos de epítomos de nueve clones de anticuerpos anti-CLCP1 (anticuerpos N.^{os} EC6-8, FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA12-3, FA14-9, FA17-9, FA19-1 y FA20-3) reactivos para CLCP1 endógeno, que se elucidó junto con el resultado del experimento de inhibición descrito anteriormente usando los anticuerpos biotinilados.

5

[Ejemplo 9] Afinidad de anticuerpo

Los tres clones que presentan una reactividad significativamente mayor se analizaron en cuanto a su afinidad relativa con el método que sigue a continuación. Cada anticuerpo purificado se analizó por citometría de flujo en las mismas condiciones (el mismo número de células H460-LNM35 (1×10^5 células); la misma concentración de cada uno de los anticuerpos purificados, la misma concentración de anticuerpo secundario (detección)) para determinar la intensidad de fluorescencia media. Además, se evaluó la afinidad relativa recogiendo datos con respecto a los cambios dependientes de la concentración de anticuerpo en la intensidad media de fluorescencia y analizando los límites de detección a concentraciones más bajas. El resultado se muestra como un gráfico en la Fig. 5. El eje horizontal del gráfico indica la concentración (ng/ml) de los anticuerpos usados, y el eje vertical indica la intensidad de fluorescencia media (MFI) determinada por citometría de flujo. El resultado mostró que la afinidad relativa era: EC6-8 > FA17-9 > FA19-1.

20

[Ejemplo 10] Evaluación de la reactividad del anticuerpo (transferencia de Western e inmunoprecipitación)

Los anticuerpos preparados como se ha descrito anteriormente se evaluaron adicionalmente y se confirmó que reconocían CLCP1 sometiendo a ensayo la reactividad con respecto a CLCP1 endógeno usando transferencia de Western e inmunoprecipitación mediante el siguiente procedimiento.

25

Como se describe en la referencia, Nagai H, *et al.*, Oncogene 26: 4025-4031 (2007), se ha establecido una sublínea que expresa de forma constitutiva un ARNs de CLCP1 como un ARN horquillado corto (ARNhc) biosintetizado en células a partir de la línea celular H460-LNM35 de CLCP1 de expresión elevada. Se demostró que el nivel de expresión del ARNm de CLCP1 estaba significativamente reducido en las células de la sublínea (línea n.^o 9 de células siCLCP1-3; Nagai H, *et al.*, Oncogene 26: 4025-4031 (2007)). La transferencia de Western se realizó usando la línea n.^o 9 de células siCLCP1-3 (supresión genética de CLCP1 en la Fig. 8) y células H460-LNM35.

30

Cada una de 2×10^6 células de la línea celular H460-LNM35 de CLCP1 de expresión elevada y la línea n.^o 9 de siCLCP1-3 se suspendieron en tampón de lisis (Tris 50 mM (pH 6,8), glicerol al 5 %, SDS al 2 %) y la concentración de proteína se determinó usando el kit de ensayo de proteínas DC (Bio-Rad). A continuación, el 2-mercaptoetanol se añadió al 5,3 % a los lisados. Después del calentamiento, 20 µg de cada uno de los lisados se sometieron a SDS-PAGE, seguido de transferencia de Western con cada uno de los anticuerpos y un anticuerpo anti-ratón o anti-conejo etiquetado con HRP. El resultado mostró que FA19-1 y FA17-9 daban señales de un tamaño idéntico (intensidad de señal: FA19-1 > FA17-9) (Fig. 12). Por otro lado, no había casi ninguna señal detectable en la línea de células n.^o 9 de siCLCP1-3. Por lo tanto, la transferencia de Western demostró que FA19-1 y FA17-9 reconocían CLCP1 de forma específica.

40

Se suspendieron 1×10^7 células de la línea celular H460-LNM35 de CLCP1 de expresión elevada en tampón de lisis para inmunoprecipitación [HEPES 10 mM (pH 7,5), NaCl 300 mM, NP-40 al 0,5 %, EDTA 5 mM, DTT 0,5 mM, x1 de Cóctel de Inhibidor de Proteasa Completo (Roche)]. A continuación, alícuotas de 1/10 se añadieron a tubos de microcentrífuga (tubos Eppendorf), y 1 µg de cada uno de los anticuerpos FA2-10, FA7-6, FA9-1, FA12-3, FA14-9, FA17-9, FA19-1, FA20-3, y EC6-8 (y anticuerpo policlonal de conejo) se añadieron a los mismos. Las mezclas resultantes se agitaron a 4 °C durante dos horas. Se añadieron 20 µl de Proteína G-sepharose (GE Healthcare) se añadió y las mezclas se agitaron durante una hora. La Proteína G-sepharose se precipitó por centrifugación a 3.000 rpm durante un minuto. Los precipitados se lavaron cuatro veces para la inmunoprecipitación. Los precipitados resultantes se sometieron a SDS-PAGE, seguido de transferencia de Western con anticuerpo FA19-1 y un anticuerpo anti-ratón etiquetado con HRP. El resultado mostró que, excepto el anticuerpo policlonal de conejo, todos los anticuerpos monoclonales daban señales del mismo tamaño que el dado por FA19-1 y FA17-9 descrito anteriormente. Por lo tanto, se demostró que los anticuerpos monoclonales reconocían CLCP1 de forma específica (panel inferior de la Fig. 7 (A)). Además, FA9-1, FA17-9, FA19-1 y EC6-8 galán señales significativamente más elevadas, lo que sugiere que los anticuerpos monoclonales presentan una reactividad muy elevada.

50

55

[Ejemplo 11] Evaluación del patrón histopatológico de tinción con anticuerpos (inmunotinción)

Las células n.^o 9 de siCLCP1-3 descritas anteriormente (panel inferior de la Fig. 8(A); supresión genética de CLCP1) y las células H460-LNM35 (panel superior de la Fig. 8(A)) se tiñeron de forma inmunohistoquímica con cuatro anticuerpos, FA9-1, FA17-9, FA19-1, y EC6-8, cada uno de los cuales como se ha descrito anteriormente, dieron una señal fuerte para la proteína de CLCP1 en inmunoprecipitación. El resultado mostró que las señales en la superficie celular se obtenían de una manera específica de células H460-LNM35 solamente con FA19-1. Por lo tanto, se demostró que solamente se podría utilizar FA19-1 para detectar CLCP1 en inmunohistoquímica de muestras de ensayo embebidas en parafina en las condiciones experimentales usadas en la presente invención (Fig. 8 (A)).

60

65

A continuación, los tejidos de cáncer de pulmón se tiñeron con FA19-1 como un ensayo. Se reveló que algunos casos clínicos de cáncer eran fuertemente positivos con FA19-1 (Fig. 8 (B) y (C)).

- 5 El anticuerpo obtenido como se ha descrito anteriormente se sometió a ensayo para evaluar si también se podría usar para evaluar la metástasis tisular. De forma específica, el ensayo se realizó con el siguiente procedimiento.

(1) Preparación de secciones

- 10 Cada muestra de ensayo clínico de cáncer de pulmón (carcinoma escamoso pulmonar o adenocarcinoma de pulmón) se fijó con formalina y a continuación se embebió en parafina. Las muestras de ensayo de tejido embebido en parafina se cortaron en trozos finos de 3 μm con un micrótopo y se montaron sobre portaobjetos de vidrio antidesprendimiento revestidos (MAS-GP, tipo A, MATSUNAMI).

15 (2) Tinción

- En lo sucesivo en el presente documento a menos que se indique de otro modo, las secciones se trataron a temperatura ambiente. Después de desparafinizar las secciones en portaobjetos de vidrio, las secciones se empaparon en Immunosaver (NISSHIN EM CO.; el Immunosaver se diluyó 200 veces con agua destilada) y se calentó en un recipiente eléctrico a 98 °C durante 50 minutos para desenmascarar el antígeno. A continuación, para inactivar la peroxidasa endógena, las secciones se trataron con metanol que contenía peróxido de hidrógeno al 3 % durante 20 minutos. Después de lavar tres veces con PBS durante cinco minutos cada lavado, las secciones se incubaron durante una hora con el anticuerpo anti-CLCP1 (FA19-1) como el anticuerpo primario, que se diluyó 250 veces con BSA al 1 %/timerosal al 1 %/PBS. Después de lavar tres veces con PBS durante cinco minutos cada uno, las secciones se incubaron durante 30 minutos con un anticuerpo de inmunoglobulina anti-ratón de caballo etiquetado con biotina (Kit Vectastain ABC, Vector Lab.) Como el anticuerpo secundario. El reactivo ABC (Kit Vectastain ABC, Vector Lab.) se añadió en una gota, y las secciones se incubaron durante 60 minutos de acuerdo con el método ABC, seguido de lavado con PBS durante cinco minutos cada lavado. La mezcla de reacción (20 mg de DAB/100 ml) de DAB (3,3'-diaminobenzidina) se preparó por disolución de dos comprimidos de DAB Tris (Muto Pure Chemicals) en 100 ml de agua destilada, y añadiendo de tres a cuatro gotas de peróxido de hidrógeno a la misma. La reacción como cromogénica se realizó empapando las secciones en la solución de reacción de DAB durante 12 minutos. Después de lavar con agua corriente y agua destilada, las secciones se trataron con hematoxilina para tinción nuclear, seguido de deshidratación, aclarado y montaje. A continuación, las secciones se observaron con un microscopio. Los resultados obtenidos por tinción de los tejidos de cáncer de pulmón se muestran en la Fig. 8 (B) y (C).

Se muestran los resultados de la tinción de las muestras de ensayo obtenidas a partir de los pacientes con cáncer de pulmón.

- 40 En la muestra de ensayo 1 (Fig. 8(B): carcinoma escamoso de pulmón), el tejido de cáncer se tiñó de forma positiva.

Panel izquierdo de la Fig. 8(B): en el tejido de cáncer de pulmón, la superficie celular se tiñó de forma positiva de una manera uniforme, mientras que el área circundante no cancerosa (denominada área estromal) era negativa en esta tinción.

- 45 Panel medio de la Fig. 8(B): en el área en la que el cáncer invade el tejido de pulmón normal, las células cancerosas invasivas se tiñeron de forma positiva mientras que el área de pulmón normal restante era negativa en esta tinción.

- 50 Panel derecho de la Fig. 8(B): el área de tejido de pulmón normal alejada del cáncer era negativa en esta tinción. La aparición similar a puntos de color oscuro representa depósitos de grano de hierro.

Como se ha descrito anteriormente, los tejidos de cáncer y sin cáncer se tiñeron de forma distinguible. Este resultado es coherente con el área de cáncer identificada por vía patológica.

- 55 En la muestra de ensayo 2 (Fig. 8(C): adenocarcinoma de pulmón), el tejido de cáncer también se tiñó de forma positiva. Sin embargo, esta muestra de ensayo se tiñó de forma ligeramente más débil (quizá debido a un nivel de expresión menor del gen de CLCP1 que en la muestra de ensayo 1), y la tinción era menos uniforme en algunas áreas, cuando se compara con la muestra de ensayo 1.

- 60 Panel izquierdo de Fig. 8(C): el tejido de cáncer de pulmón se tiñó de forma positiva de una manera uniforme. La superficie celular se tiñó de manera fuertemente positiva, y el citoplasma se tiñó también de manera positiva. El área no cancerosa circundante (denominada área estromal) se tiñó de manera negativa.

I

- 65 Panel medio de la Fig. 8(C): las otras porciones del mismo tejido de cáncer de pulmón estaban mayormente teñidas

de manera positiva. Sin embargo, la tinción era ligeramente menos uniforme. En esta tinción había células de cáncer negativas. En el área no cancerosa circundante (denominada área estromal), solamente una pequeña población de células estromales se tiñeron excepcionalmente de manera positiva, mientras que la mayor parte de la área no cancerosa circundante se tiñó de manera negativa.

5 Panel derecho de la Fig. 8(C): el área de tejido de pulmón normal alejada del cáncer se tiñó de manera negativa. La aparición similar a puntos de color oscuro representa depósitos de grano de hierro.

10 Como se ha descrito anteriormente, los tejidos de cáncer y sin cáncer también se tiñeron de forma distinguible en la muestra de ensayo 2. Este resultado es coherente con el área de cáncer identificada por vía patológica.

15 El resultado descrito anteriormente demuestra que FA19-1 se puede usar en inmunohistoquímica de muestras de ensayo embebidas en parafina. Cuando la intensidad de la tinción en un tejido patológico es más fuerte que la de un área no cancerosa en las muestras de ensayo de tejido de pulmón mostradas en la Fig. 8, se diagnostica que el tejido patológico está afectado potencialmente con cáncer de pulmón. Las áreas teñidas de manera positiva con el anticuerpo de la presente invención eran coherentes con aquéllas de las que se sospechaba por vía patomorfológica que eran cáncer de pulmón. Las áreas teñidas de manera negativa con el anticuerpo de la presente invención son coherentes con las que se supone que son normales. El resultado está generalmente de acuerdo con el hallazgo patológico basándose en observación microscópica.

20 [Ejemplo 12] Evaluación del patrón de tinción del anticuerpo (inmunotinción) de tejido normal

Las secciones de los tejidos normales que se describen a continuación se sometieron a ensayo para el patrón de tinción de FA19-1 con el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 11.

25 El resultado mostraba que no había una tinción intensa, específica, excepto en el citoplasma del epitelio folicular.

[Tabla 1]

TINCIÓN DE TEJIDO NORMAL HUMANO USANDO EL ANTICUERPO FA19-1			
	TINCIÓN DE LA MEMBRANA CELULAR	TINCIÓN DEL CITOPLASMA	NOTAS
CEREBRO	-	-	
BRONQUIOS	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN EPITELIO CILIADO BRONQUIAL/GLÁNDULA MUCOSAL
CORAZÓN	-	-	
ESÓFAGO	-	-	
ESTÓMAGO	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN GLÁNDULAS PILÓRICAS
INTESTINO GRUESO	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN EPITELIO DE LA CRIPTA MUCOSAL
RIÑÓN	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN TÚBULO RENAL
PÁNCREAS	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN PEQUEÑA CANTIDAD DE CÉLULAS DE ORIGEN DESCONOCIDO
HÍGADO	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN CÉLULA Y HEPÁTICA Y CONDUCTO BILIAR
BAZO	-	-	
GLÁNDULA TIROIDES	-	-	IMAGEN PSEUDO-POSITIVA TEÑIDA EN EPITELIO FOLICULAR

[Ejemplo 13] Predicción del pronóstico de pacientes de cáncer de pulmón mediante histoquímica

La correlación entre la predicción de pronóstico y el patrón de tinción de muestra de ensayo de cáncer de pulmón se evaluó mediante la tinción de muestras de ensayo de cáncer de pulmón con el anticuerpo FA19-1 anti-CLCP1 con el mismo método histoquímico que se ha descrito anteriormente.

Los tejidos de cáncer de pulmón se tiñeron (tinción de la membrana celular) con el anticuerpo anti-CLCP1. El resultado mostraba que la tasa de supervivencia de Kaplan-Meier a un año (12 meses) después de la cirugía era de un 73 % en el grupo de casos clínicos fuertemente positivos en la tinción histológica con el anticuerpo anti-CLCP1 (fuertemente positiva para tinción de la membrana celular), mientras que la tasa era de un 93 % en el grupo de casos clínicos débilmente positivos o negativos (débilmente positivos o negativos para tinción de la membrana celular). La tasa de supervivencia a tres años (36 meses) después de la cirugía era de un 55 % en el grupo de casos fuertemente positivos, mientras que la tasa era de un 90 % en el grupo de casos débilmente positivos o negativos. La tasa de supervivencia era constantemente menor en el grupo de casos fuertemente positivos. Las diferencias se evaluaron mediante el ensayo de rango logarítmico o el ensayo de Wilcoxon generalizado (ensayo de Gehan-Wilcoxon), que normalmente se usan para evaluar diferencias significativas en la tasa de supervivencia entre dos grupos. El resultado fue $p = 0,012$ en el ensayo de rango logarítmico y $p = 0,0072$ en el ensayo de Wilcoxon generalizado, lo que sugiere que la tasa de supervivencia es de forma estadísticamente significativa menor en el grupo de casos fuertemente positivos (Fig. 37A).

La reactividad inmunohistológica del anticuerpo se clasificó en tres grupos: fuertemente positivo (+), débilmente positivo (\pm), y negativo (-). De forma específica, fuertemente positivo se refiere a que la membrana celular está claramente teñida en su contorno (el contorno de la membrana celular es visible) como se muestra en el panel superior de la Fig. 37B; débilmente positivo se refiere a que la membrana celular solo se tiñe ligeramente (el contorno de la membrana celular es invisible) como se muestra en el panel inferior de la Fig. 37B; y negativo se refiere a que la membrana celular no está teñida en absoluto.

[Ejemplo 14] Evaluación de actividad inhibitoria de invasión

Las células se expusieron a cada anticuerpo como sigue a continuación. En primer lugar, las células H460-LNM35 se suspendieron a una concentración de 5×10^4 a 2×10^5 células/ml en medio RPMI1640 (FCS al 0,25 %). A continuación, se tomaron alícuotas de la suspensión celular preparada en tubos de microcentrifuga (tubos Eppendorf), y cada anticuerpo se añadió a una concentración de 1,5 a 5 $\mu\text{g/ml}$ a la misma. Se permitió que los tubos reposaran a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, las células procesadas se usaron en el posterior ensayo de invasión de acuerdo con un método descrito en una referencia (Kozaki K *et al.*, Cancer Res. 60: 2535-40 (2000)). De forma específica, 1 ml de RPMI1640 (FCS al 5 %) se añadió a cada pocillo (cámara de la parte inferior) de una placa de 24 pocillos, y a continuación un inserto de cultivo celular con poros de 8 μm , revestido con 10 μg de Matrigel de matriz de membrana basal reconstituida, o una "Cámara de Invasión de Matrigel (Becton Dickinson)" con el revestimiento de Matrigel de matriz de membrana basal reconstituida se puso en cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Se tomaron alícuotas (0,5 ml) de la suspensión de células H460-LNM35 (de 5×10^4 a 2×10^5 células/ml) después de la exposición del anticuerpo en RPMI1640 (FCS al 0,25 %) en cada cámara superior (de $2,5 \times 10^4$ a 1×10^5 células/cámara). A continuación, las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO_2 al 5 % durante 48 horas. Las células restantes y el Matrigel se retiraron minuciosamente de las cámaras superiores con hisopos de algodón. Después de fijar con una solución de etanol al 70 %, las células en los pocillos de la parte inferior se tiñeron con una solución de tinción de Giemsa. Se hizo el recuento de las células en los pocillos de la parte inferior bajo un microscopio. El porcentaje de actividad inhibitoria de invasión con respecto a la del grupo no tratado con anticuerpo se determinó para cada anticuerpo de acuerdo con la fórmula que se muestra a continuación. El resultado se muestra en la Fig. 6(A).

Actividad inhibitoria de invasión (%) = (Número de células de cáncer invasoras en presencia de un anticuerpo / Número de células de cáncer invasoras en ausencia de anticuerpo) x 100

El resultado mostrado en la Fig. 6(A) demuestra que los anticuerpos FA17-9 y FA19-1, en particular, tienen la actividad de inhibición más fuerte de inhibición de la invasión de células de la línea H460-LNM35 de células de cáncer de pulmón humano altamente metastásica que el anticuerpo de control (IgG de ratón).

[Ejemplo 15] Evaluación de actividad inhibitoria de migración

De la misma manera que se ha descrito anteriormente, las células se expusieron a cada anticuerpo como sigue a continuación. En primer lugar, las células H460-LNM35 se suspendieron a una concentración de 5×10^4 a 2×10^5 células/ml en medio de RPMI1640 (FCS al 0,25 %). A continuación, se tomaron alícuotas de la suspensión celular preparada en tubos de microcentrifuga (tubos Eppendorf), y cada anticuerpo se añadió a una concentración de 1,5 a 5 $\mu\text{g/ml}$ a la misma. Se permitió que los tubos reposaran a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación, las células procesadas se usaron en el posterior ensayo de motilidad de acuerdo con un método descrito en una referencia (Kozaki K *et al.*, Cancer Res. 60: 2535-40 (2000)). De forma específica, 1 ml de RPMI1640 (FCS al 5 %) se añadió a cada pocillo (cámara de la parte inferior) de una placa de 24 pocillos, y a

continuación un inserto de cultivo celular con poros de 8 µm (Becton Dickinson) se puso se puso en cada pocillo de la placa de 24 pocillos. Se tomaron alícuotas (0,5 ml) de la suspensión de células H460-LNM35 (de 5 x 10⁴ a 2 x 10⁵ células/ml) después de la exposición del anticuerpo en RPMI1640 (FCS al 0,25 %) en cada cámara superior (de 2,5 x 10⁴ a 1 x 10⁵ células/cámara). A continuación, las células se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. Las células restantes se retiraron minuciosamente de las cámaras superiores con hisopos de algodón. Después de fijar con una solución de etanol al 70 %, las células en los pocillos de la parte inferior se tiñeron con una solución de tinción de Giemsa. Se hizo el recuento de las células en los pocillos de la parte inferior bajo un microscopio. El porcentaje de motilidad con respecto al grupo no tratado con anticuerpo se determinó para cada anticuerpo de acuerdo con la fórmula que se muestra a continuación. El resultado se muestra en la Fig. 6(B).

$$\text{Motilidad (\%)} = (\text{Número de células cancerosas que migran en presencia de anticuerpo} / \text{Número de células cancerosas que migran en ausencia de anticuerpo}) \times 100$$

El resultado que se muestra en la Fig. 6(B) demuestra que los anticuerpos FA17-9 y FA19-1, en particular, tienen una actividad más fuerte de inhibición de la migración de células de la línea H460-LNM35 de células de cáncer de pulmón humano altamente metastásico que el anticuerpo de control (IgG de ratón).

[Ejemplo 16] Análisis de la expresión de CLCP1 en células de líneas de células alta capacidad de metástasis y baja capacidad de metástasis obtenidas a partir de NCI-H460

Previamente, los presentes inventores aislaron dos tipos de sublíneas o a partir de la línea precursora NCI-H460 basándose en el grado de actividad metastásica de las células trasplantadas en ratones. La tinción con FA19-1 mostraba que el nivel de expresión de CLCP1 en la superficie celular de NCI-H460-LNM35, una línea de alta capacidad de metástasis, era más elevada que la de NCI-H460-N15, una línea de baja capacidad de metástasis (Fig. 17). La línea precursora NCI-H460 también se tiñó con FA19-1 con el mismo método. El resultado demostraba que las células son una población de células heterogéneas. Por lo tanto, por primera vez, se sugería que CLCP1 expresado en la superficie celular estaba implicado en cierto modo en la actividad metastásica (Fig. 17).

[Ejemplo 17] Patrón de expresión del antígeno CLCP1 en diversas líneas de células de cáncer (FCM)

El patrón de expresión de CLCP1 en diversas líneas de células de cáncer se evaluó con FCM usando un anticuerpo anti-CLCP1 (FA19-1; 5 µg/ml). Las líneas celulares usadas orígenes se enumeran en las Tablas 2-1 y 2-1.

[Tabla 2-1]

NOMBRE DE LA CÉLULA	ORIGEN DEL CÁNCER	NÚMERO
A549	CÁNCER DE PULMÓN	CCL-185
ChaGo-K-1	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-168
DMS114	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-2066
NCI-H1299	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5803
NCI-H1373	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5866
NCI-H1793	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5896
NCI-H2170	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5928
NCI-H226	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5826
NCI-H358	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5807
NCI-H460	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-177
NCI-H520	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-182
NCI-H522	CÁNCER DE PULMÓN	CRL-5810
NCI-H596	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-178
LC174	CÁNCER DE PULMÓN	Centro de Cáncer de Aichi

ES 2 613 841 T3

LC176	CÁNCER DE PULMÓN	Centro de Cáncer de Aichi
LC319	CÁNCER DE PULMÓN	Centro de Cáncer de Aichi
PC-14	CÁNCER DE PULMÓN	ECACC90071810
SK-LU-1	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-57
SK-MES-1	CÁNCER DE PULMÓN	HTB-58
GCIY	CÁNCER DE ESTÓMAGO	RCB0555
HGC-27	CÁNCER DE ESTÓMAGO	RCB0500
KATOIII	CÁNCER DE ESTÓMAGO	HTB-103
MKN-1	CÁNCER DE ESTÓMAGO	JCRB0252
MKN-45	CÁNCER DE ESTÓMAGO	JCRB0254
MKN74	CÁNCER DE ESTÓMAGO	JCRB0255
OCUM-1	CÁNCER DE ESTÓMAGO	JCRB0192
SCH	CÁNCER DE ESTÓMAGO	JCRB0251
Caco-2	CÁNCER DE INTESTINO GRUESO	HTB-37
LOVO	CÁNCER DE INTESTINO GRUESO	CCL-229
SW480	CÁNCER DE INTESTINO GRUESO	CCL-228
Caki-1	CÁNCER DE RIÑÓN	HTB-46
KLM-1	CÁNCER DE PÁNCREAS	RCB2138
MIA Paca-2	CÁNCER DE PÁNCREAS	CRL-1420
PANC-1	CÁNCER DE PÁNCREAS	CRL-1469
PK1	CÁNCER DE PÁNCREAS	RCB1972

[Tabla 2-2]

PK-45p	CÁNCER DE PÁNCREAS	RCB2141
PK59	CÁNCER DE PÁNCREAS	RCB1901
BT-20	CÁNCER DE MAMA	HTB-19
BT-474	CÁNCER DE MAMA	HTB-20
BT-549	CÁNCER DE MAMA	HTB-122
HCC1395	CÁNCER DE MAMA	CRL-2324
HCC1500	CÁNCER DE MAMA	CRL-2329
MCF7	CÁNCER DE MAMA	HTB-22
SK-BR-3	CÁNCER DE MAMA	HTB-30
T-47D	CÁNCER DE MAMA	HTB-133
ZR-75-1	CÁNCER DE MAMA	CRL-1500
22Rv1	CÁNCER DE PRÓSTATA	CRL-2505

PC3	CÁNCER DE PRÓSTATA	CRL-1435
T24	CÁNCER DE VEJIGA	HTB-4
Hela	CÁNCER DE CUELLO UTERINO	CCL-2
T98G	NEUROBLASTOMA	CRL-1690
A431	CÁNCER EPIDERMOIDE	CRL-1555
Raji	LINFOMA	CCL-86
Daudi	LINFOMA	CCL-213
Jurkat, clon E6-1	LINFOMA	TIB-152
HL-60	LINFOMA	CCL-240
THP-1	LEUCEMIA	TIB-202
U-937	LEUCEMIA	CRL-1593.2
HEL	LEUCEMIA	ACC11
MEG-01	LEUCEMIA	CRL-2021
HUV-EC-C	CÉLULA ENDOTELIAL VASCULAR	CRL-1730
293T	CÉLULA DE RIÑÓN FETAL	RCB2202

El resultado mostraba que CLCP1 se expresaba a niveles elevados, como se observa en las Figs. 18 y 19. Las intensidades de fluorescencia media (MFI) se muestran en la Fig. 20.

- 5 Además del cáncer de pulmón, las líneas de células de cáncer que expresan CLCP1 a niveles elevados incluyen, en particular, cáncer de riñón (por ejemplo, línea de células Caki-1), cáncer de vejiga (por ejemplo, línea de células T24), cáncer de próstata (por ejemplo, línea de células PC3), cáncer de páncreas (por ejemplo, línea de células PK-45p), cáncer de estómago (por ejemplo, línea de células GCIY), cáncer de intestino grueso (por ejemplo, línea de células SW480), y cáncer de mama (por ejemplo, línea de células BT-20). En particular, cuando la MFI es 20 o superior en la Fig. 20, se puede decir que la expresión está aumentada de forma significativa.

[Ejemplo 18] Análisis funcional de anticuerpos monoclonales (WB y FCM)

15 De la misma manera que se ha descrito anteriormente, las células se expusieron a cada anticuerpo como sigue a continuación. En primer lugar, las células H460-LNM35 se suspendieron a una concentración de 6×10^4 células/ml en medio RPMI1640 (FCS al 10 %). Se tomaron alícuotas de la suspensión celular preparada (0,5 ml) en placas de cultivo de 6 pocillos (Becton Dickinson) (3×10^4 células/pocillo). A continuación, los anticuerpos indicados se añadieron a las concentraciones indicadas a cada pocillo (Fig. 7(B): 1, 2,5, y 5 $\mu\text{g/ml}$; Fig. 13: 0,5, 1, 2,5, y 5 $\mu\text{g/ml}$), y los pocillo se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. Después de lavar con PBS, se añadieron 200 μl de tampón de lisis (Tris 50 mM (pH 6,8), glicerol al 5 %, SDS al 2 %) a cada pocillo para preparar lisados celulares. De la misma manera que se ha descrito anteriormente, las concentraciones de proteína de los lisados celulares se determinaron usando el de Ensayo de Proteína de DC (Bio-Rad). A continuación, se añadió 2-mercaptoetanol a un 5,3 % a los lisados. Después de calentar, 5 μg de cada uno de los lisados se sometieron a SDS-PAGE, seguido de transferencia de Western con anticuerpo FA19-1 y un anticuerpo anti-ratón etiquetado con HRP. El resultado mostraba que FA9-1, FA17-9, FA19-1, y EC6-8 reducían la señal de CLCP1 en comparación con las células sin tratar con las células expuestas a la IgG de ratón de control (Figs. 7(B) y 13). Se demostró que la exposición a un anticuerpo anti-CLCP1 inducía la degradación de CLCP1, del mismo modo a la inducida por la exposición a SEMA4B que se había informado en Nagai H, *et al.*, *Oncogene* 26: 4025-4031 (2007).

30 De la misma manera, las células H460-LNM35 se expusieron a FA17-9, FA19-1, o IgG de ratón de control (a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$ o 5 $\mu\text{g/ml}$) en placas de cultivo de 6 pocillos, y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 % durante 24 horas. Después de lavar con PBS, las se desprendieron usando PBS/EDTA 0,5 mM para preparar suspensiones celulares. A continuación, las células se analizaron por citometría de flujo con FACS Caliber (Becton Dickinson) usando los mismos anticuerpos usados en el tratamiento mencionado anteriormente y un anticuerpo anti-ratón etiquetado con Alexa Flour 488 (Molecular Probe) (Fig. 14). El resultado mostraba que la exposición a FA19-1 reducía el nivel de la expresión de CLCP1 en la superficie celular. Por lo tanto, se demostraba que la exposición al anticuerpo FA19-1 anti-CLCP1 inducía la degradación de CLCP1 en la superficie celular o internalización de

CLCP1 en las células.

[Ejemplo 19] Preparación de nuevos anticuerpos

- 5 Los clones de los nuevos anticuerpos 2AA_62-4, 2AA_83-6, 2AA_111-3, 2AA_171-1, y 2AA_197-3 se aislaron usando, como un inmunógeno, una proteína purificada del dominio extracelular (ECD: dominio extra-celular) del CLCP1 humano, que se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 3. Además, los clones de los nuevos anticuerpos 6AA_17-2, 6AA_44-3, 6AA_60-1, 6AA_61-2, y que 6AA_95-5 se aislaron usando, como un inmunógeno, una proteína parcial purificada (FA) que contenía el dominio FA58C del CLCP1 humano, que se preparó como se ha descrito en el Ejemplo 3.

[Ejemplo 20] Evaluación de nuevos anticuerpos para su afinidad de unión por FCM

- 15 Los nuevos anticuerpos se evaluaron para su afinidad de unión por FCM usando el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 9. Se mostró que tres clones (2AA_171-1, 6AA_17-2, y 2AA_197-3) eran más reactivos que FA19-1 (Fig. 24).

[Ejemplo 21] Formación de mapas de epítipo es de nuevos anticuerpos

- 20 (1) Predicción de dominios reconocidos basándose en la reactividad con respecto a fragmentos de proteína parcial en ELISA

25 Los dominios reconocidos por los anticuerpos se predijeron mediante by ELISA usando los antígenos de inmunización preparados como se ha descrito en el Ejemplo 3. Cada una de la proteína purificada del dominio extracelular de CLCP1 humano y proteína parcial purificada que contenía el dominio FA58C de CLCP1 humano se diluyeron hasta 0,5 µg/ml con PBS. Las soluciones resultantes se añadieron a 50 µl/pocillo a placas (NUNC; MaxiSorp). Se permitió que las placas reposaran a temperatura ambiente durante cuatro horas o más para inmovilizar las proteínas. Después de bloquear con BSA, cada anticuerpo diluido a 1 µg/ml con PBS se añadió a las placas para la primera reacción. Se permitió que las placas reposaran a temperatura ambiente durante una hora.

30 Para la segunda reacción se añadió un anticuerpo anti-ratón etiquetado con HRP de acuerdo con un método convencional. Los anticuerpos unidos a cada proteína inmovilizada se detectaron mediante esta reacción. El resultado mostraba que 2AA_171-1 reconocía el dominio extracelular pero no la proteína parcial que contenía el dominio FA58C (Fig. 25).

- 35 (2) Predicción basándose en un experimento de inhibición competitiva con FCM

(Descripción específica en el procedimiento del método experimental)

40 Los experimentos de inhibición competitiva en los nuevos anticuerpos se realizaron con FCM usando el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 7. Los experimentos de inhibición se consiguieron mediante el uso de todas las combinaciones de anticuerpos biotinilados y anticuerpos no etiquetados. Como un ejemplo, el resultado en tres clones (2AA_171-1, 6AA_17-2, y 2AA_197-3) que se encontró que eran más reactivos que FA19-1 con FCM, se muestra en la Tabla 3 y en la Fig. 31. 6AA_17-2 y 2AA_62-4 competían tanto con EC6-8 como con FA19-1.

45

[Tabla 3]

(A)														
		ANTICUERPO DE INHIBICION												
		2AA_62-4	2AA_83-6	2AA_111-3	2AA_171-1	2AA_197-3	6AA_7-2	6AA_35-4	6AA_44-3	6AA_60-1	6AA_61-2	6AA_95-5	FA19-1	EC6-8
CONCENTRACION DE ANTICUERPO DE INHIBICION [µg/ml]	0	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16	5,16
	0,5	5,63	5,39	5,40	4,81	3,50	5,55	5,10	5,23	5,08	5,11	4,87	5,10	5,23
	2,5	5,53	5,74	5,92	4,74	1,84	5,74	5,03	5,21	5,28	5,24	5,49	5,29	4,95
(B)														
		ANTICUERPO DE INHIBICION												
		2AA_62-4	2AA_83-6	2AA_111-3	2AA_171-1	2AA_197-3	6AA_7-2	6AA_35-4	6AA_44-3	6AA_60-1	6AA_61-2	6AA_95-5	FA19-1	EC6-8
CONCENTRACION DE ANTICUERPO DE INHIBICION [µg/ml] g/ml	0	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82	7,82
	0,5	7,34	8,04	7,49	5,18	7,27	7,51	7,15	7,44	7,14	7,46	7,35	7,62	7,67
	2,5	7,65	7,75	7,61	2,64	6,65	7,27	7,75	7,33	7,49	6,55	7,72	7,59	8,11
(C)														
		ANTICUERPO DE INHIBICION												
		2AA_62-41	2AA_83-6	2AA_11-3	2AA_171-1	2AA_197-3	6AA_17-2	6AA_35-4	6AA_44-3	6AA_60-1	6AA_61-2	6AA_95-5	FA19-1	EC6-8
CONCENTRACION DE ANTICUERPO DE INHIBICION [µg/ml] g/l	0	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87	4,87
	0,5	5,03	5,94	5,23	5,49	5,86	3,38	5,37	5,63	5,86	5,78	5,74	5,08	3,61
	2,5	4,39	6,13	5,36	5,52	5,57	1,67	5,29	5,81	6,26	6,34	5,92	3,37	2,12

(3) Formación de grupos de epítomos

La formación de grupos de epítomos se realizó basándose en los resultados que se describen en (1) y (2). El resultado de predicción se muestra en la Fig. 33. Solamente 2AA_171-1 reconoce la parte exterior de la región que contiene a FA58C y los otros reconocen la región que contiene a FA58C. 6AA_17-2 y 2AA_62-4 compiten tanto con EC6-8 como con FA19-1, y reconocen un epítomo adyacente reconocido por los dos. 2AA_83-6, 6AA_44-3, 6AA_60-1, 6a_61-2, y 6AA_95-5 reconocen un epítomo idéntico, pero el epítomo era diferente del presentado por EC6-8 y FA19-1. 2AA_111-3 y 2AA_197-3 no competían con ningún anticuerpo.

10 [Ejemplo 22] Evaluación de la internalización celular mediante FCM

Con el mismo método que se ha descrito en el Ejemplo 18, las células NCI-H460-LNM35 o A549 cultivadas en placas de 6 pocillos se expusieron a cada uno de los anticuerpos no etiquetados (5 µg/ml) durante 24 horas, y a continuación se desprendieron con PBS/EDTA 0,5 mM. La molécula de CLCP1 restante en la membrana celular se detectó mediante FCM (Fig. 34) o WB (Fig. 35) usando los anticuerpos biotinilados. El resultado presentaba una fuerte actividad de internalización.

La Fig. 36 muestra los resultados del análisis de conversión de la porción de las moléculas restantes en un valor de MFI tomando el líder de CLCP1 detectado en la membrana celular en presencia del anticuerpo de control en la Fig. 34 para que fuera un 100 %. Cuando se compara con la actividad de inducción de internalización de FA19-1 que tiene alta actividad inhibitoria de metástasis, se encontró que tres clones eran anticuerpos funcionales con una actividad de inducción de la internalización más elevada que FA19-1 (Fig. 36).

25 [Ejemplo 23] Biacore

Para analizar la actividad de unión por vía cinética, se realizó un ensayo de actividad de unión usando Biacore. Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences) se usó durante todo el proceso que se describe a continuación. El sistema de evaluación usado fue el método de captura usando un anticuerpo anti-ratón como una captura.

Un anticuerpo anti-ratón (GE Healthcare Bio-Sciences) se inmovilizó en el chip sensor de CM5 (GE Healthcare Bio-Sciences) mediante el método de acoplamiento de amino. Diversos anticuerpos monoclonales diluidos a 2 µg/ml con tampón de HBS EP (GE Healthcare Bio-Sciences) se inyectaron a 10 µl/min sobre el chip. A continuación, una proteína purificada del dominio extracelular completo de CLCP1 obtenida a partir de 293T se diluyó en una serie de dilución de dos veces hasta cinco etapas, y se inyectó como un analito a una tasa de 20 µl/min. Las concentraciones de los diluidos de cada anticuerpo monoclonal como un analitos se determinaron como sigue a continuación. En primer lugar, el valor de KD (M) para cada anticuerpo se calculó a una concentración de analitos fijada previamente de 5 µg/ml, y a continuación comenzando a una concentración 10 veces más elevada que la concentración (M) que corresponde al valor de KD, el analito se diluyó en una serie de dilución de dos veces hasta cinco etapas. Los sensogramas resultante se analizaron para calcular las constantes de tasa de asociación y disociación para cada anticuerpo. El valor de KD se determinó a partir de las constantes de tasa (Fig. 39).

[Ejemplo 24] Aislamiento de los genes de VH y VL de anticuerpo, e identificación de las CDR

Los hibridomas positivos que se seleccionaron se cultivaron, y los ARN totales se prepararon a partir de los mismos mediante un método convencional. A continuación, los ADNc se aislaron mediante 5'-RACE usando el kit GeneRacer™ (Invitrogen). Los genes de VH (ADNc) se aislaron mediante PCR [35 ciclos de (94 °C durante 30 segundos, 57 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 50 segundos)] usando los ADNc como un molde con Plutinium Taq High Fidelity (Invitrogen) y cebador en la posición 5' GeneRacer™ [5'-CGACTGGAGCAGGACTGA-3' (SEQ ID NO: 33)] y CH1 [región 1 constante de IgG1 de ratón] y cebador en la posición 3' (5'-AATTTTCTTGTCACCTGG-3' (SEQ ID NO: 34)]. De forma análoga, los genes de VL (ADNc) también se aislaron mediante PCR usando el cebador en la posición 5' GeneRacer™ y Cκ (región constante de κ) y cebador en la posición 3' [5'-CTAACACTCATTCTGTTGAAGCTCT-3' (SEQ ID NO: 35)].

Cada uno de los genes de VH y VL se subclonaron en el vector pT7Blue, y a continuación sus secuencias se determinaron usando un secuenciador automático (Applied Biosystems) o un secuenciador de fluorescencia automático. Las secuencias de aminoácidos de VH y VL, y las respectivas secuencias de CDR se dedujeron a partir de las secuencias de nucleótidos obtenidas que codifican VH y VL (Figs. 9 a 11, y Fig. 38).

A continuación se muestran las respectivas secuencias identificadas.

(Secuencia de aminoácidos de FA17-9)

- VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7
- VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8
- VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9
- VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12

VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56
 VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13
 VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6
 VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11

5
 (Secuencia de nucleótidos de FA17-9)

VH: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 5
 VL: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 10

10
 (Secuencia de aminoácidos de FA19-1)

VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16
 VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17
 VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18
 VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21
 VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57
 VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22
 VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15
 VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20

20
 (Secuencia de nucleótidos de FA19-1)

VH: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14
 VL: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 19

25
 (Secuencia de aminoácidos de 6AA_17-2)

VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60
 VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61
 VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62
 VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65
 VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66
 VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67
 VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59
 VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64

35
 (Secuencia de nucleótidos de 6AA_17-2)

VH: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 58
 VL: la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 63

40

[Ejemplo 25] Preparación y evaluación de anticuerpos quiméricos (FA19-1 y FA17-9)

45 Los cebadores para la amplificación de PCR se diseñaron basándose en las secuencias genéticas identificadas. Los cebadores se muestran a continuación. FA17-9 y FA19-1 son anticuerpos obtenidos a partir de la misma secuencia genómica. Por lo tanto, para estos anticuerpos se usaron los mismos cebadores.

Cebador directo de cadena pesada: 5'-CCCaagcttACCATGGAATGGAGTTGGATATTTTC-3' (SEQ ID NO: 68) y
 Cebador inverso de cadena pesada: 5'-CCGctcgagACGGTGACCGTGGTCC-3' (SEQ ID NO: 69)
 Cebador directo de cadena ligera: 5'-CCCaagcttACCATGAGACCGTCTATTTCAGTTCC-3' (SEQ ID NO: 70)
 Cebador inverso de cadena ligera: 5'-AATAcgtacgTTTGATTTCCAGCTTGGTCCC-3' (SEQ ID NO: 71)

50

(las letras en minúsculas indican secuencia de enzimas de restricción)

55 Mediante un método convencional, los productos de PCR amplificados usando los cebadores que se han descrito anteriormente se insertaron en un vector de producción de anticuerpo (LONZA) que portaba la región constante de la IgG1 humana como un inserto. Después de establecer las líneas de células productoras de anticuerpo quimérico, los anticuerpos quiméricos se purificaron a partir de los sobrenadantes del cultivo usando la Proteína A de acuerdo con el protocolo recomendado LONZA Co.
 60

El anticuerpo FA17-9 quimérico y el anticuerpo FA19-1 quimérico se evaluaron por su reactividad media FCM. A concentraciones de 10 a 0,01 µg/ml, los anticuerpos presentaban una actividad de unión comparable con la de los anticuerpos de ratón originales (Fig. 21).

65

[Ejemplo 26] Ensayo de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo)

El ensayo de ADCC se realizó mientras que se cambiaba la concentración del anticuerpo de 0,1 a 10 µg/ml o la proporción de E/T (proporción de efector/diana) de 100 a 5. Los anticuerpos usados fueron el anticuerpo FA17-9 quimérico y el anticuerpo FA19-1 quimérico cuyas actividades de unión se confirmaron en el Ejemplo 25. Las células diana usadas eran líneas de células de cáncer, por ejemplo, NCI-H460-LNM35. Las células efectoras usadas eran PBMC preparadas a partir de sangre periférica humana mediante un método convencional usando centrifugación en gradiente de densidad.

La ADCC se evaluó mediante el ensayo de liberación de lactato deshidrogenasa. La citotoxicidad (%) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$[\% \text{ de Citotoxicidad}] = 100 \times (E - S_E - S_T) / (M - S_T)$$

en la que E representa "liberación experimental", que se refiere a la actividad de la lactato deshidrogenasa liberada a partir de células diana durante la coincubación de células diana con anticuerpo y células efectoras; S_E representa la actividad de lactato deshidrogenasa liberada de forma espontánea a partir de células efectoras; S_T representa la idea de lactato deshidrogenasa liberada de forma espontánea a partir de células diana; y M representa la actividad de lactato deshidrogenasa liberada de forma máxima a partir de células diana después de adición de solución de lisis (Triton X-100 al 9 %).

(1) ADCC de anticuerpo FA19-1 quimérico y anticuerpo FA17-9 quimérico en células NCI-H460-LNM35

El ensayo de ADCC se realizó usando como diana células NCI-H460-LNM35 a la vez que se cambiaba a la concentración del anticuerpo (Fig. 22A) o la proporción de E/T (proporción de efector/diana) (Fig. 22B). La ADCC frente a 10^4 células diana (NCI-H460-LNM35) se determinó por adición de anticuerpo quimérico a 10 µg/ml, 1 µg/ml, o 0,1 µg/ml en la condición fijada de 2×10^5 células receptoras, y se calculó de acuerdo con la fórmula mencionada anteriormente. El resultado mostraba que el anticuerpo FA19-1 quimérico tiene una ADCC más elevada que el anticuerpo FA17-9 quimérico. El efecto citotóxico era más elevado a una concentración de anticuerpo de 10 µg/ml. A continuación, para someter a ensayo la influencia de la proporción de E/T, la ADCC de nuevo frente a 10^4 células diana se evaluó a una concentración de anticuerpo fijada de 10 µg/ml en presencia de un número variable de células efectoras: número de células efectoras 100 veces más elevado (10^6 células), 50 veces más elevado (5×10^5 células), 20 veces más elevado (2×10^5 células), 10 veces más elevado (10^5 células), y 5 veces más elevado (5×10^4 células). El resultado mostraba que la ADCC era más fuerte a una proporción de E/T de 50 y la citotoxicidad será de un 32,4 % en presencia de anticuerpo FA19-1 quimérico.

(2) ADCC frente a NCI-H460-LNM35 o A549 en presencia de anticuerpo FA19-1 quimérico (diversos donantes)

La ADCC frente a células diana NCI-H460-LNM35 y A549 se evaluó en presencia de células efectoras obtenidas a partir de cada uno de cinco donantes (A a E) en las condiciones en las que se observaba la ADCC máxima en el ensayo que se ha descrito anteriormente (en presencia de 10 µg/ml de anticuerpo quimérico a una proporción de E/T de 50). El resultado mostraba que la citotoxicidad se observaba con cada donante y era particularmente fuerte (47,1 %) frente a CLCP1 de expresión elevada de A549 (Fig. 23). Por lo tanto, los presentes inventores por primera vez descubrieron la citotoxicidad inducida con el uso de anticuerpos frente a CLCP1.

[Ejemplo 27] Producción de anticuerpo humanizado (FA19-1)

Se seleccionaron armazones humanos y las CDR se reemplazaron con las del anticuerpo monoclonal de ratón FA19-1 de acuerdo con el método de injerto de CDR.

De forma específica, la búsqueda de homología se realizó por separado para el armazón de la región variable de cadena pesada y el armazón de la región variable de cadena ligera. El resultado revelaba que las regiones marco conservadas de la región variable de cadena pesada del anticuerpo FA19-1 [en lo sucesivo en el presente documento, regiones FR1 a FR4 (SEQ ID NOs: 36 a 39); en lo sucesivo en el presente documento, de forma colectiva FR] eran altamente homologadas con las regiones FR (SEQ ID NOs: 41 a 44) del anticuerpo humano de número de registro U00570 (SEQ ID NO: 40) (véase la Fig. 40). La homología entre las FR de cadena pesada del anticuerpo de ratón FA19-1 y el anticuerpo humano injertado con CDR era $67/87 = 77,0\%$. La secuencia de aminoácidos se diseñó para injertar de forma adecuada la CDR1, CDR2, y CDR3 de cadena pesada de FA19-1 (SEQ ID NOs: 16 a 18) en la región FR del anticuerpo humano de número de registro U00570. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos se diseñó para la región variable de cadena pesada del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO: 45). En lo sucesivo en el presente documento, la abreviatura "FA19RHA" se usa para la cadena pesada humanizada.

De forma análoga, se encontró que la FR1 a FR4 (SEQ ID NOs: 46 a 49; en lo sucesivo en el presente documento, de forma colectiva FR) de la cadena ligera del anticuerpo FA19-1 era altamente homologadas para las regiones FR

(SEQ ID NOs: 51 a 54) del anticuerpo humano de número de registro U96396 (SEQ ID NO: 50) (véase la Fig. 41). La homología de la FR de cadena ligera entre el anticuerpo de ratón FA19-1 y el anticuerpo humano injertado con CDR era $63/80 = 78,8\%$. La secuencia de aminoácidos se diseñó para injertar de forma adecuada la CDR1, CDR2, y CDR3 (SEQ ID NOs: 21, 57, y que 22) de cadena ligera de FA19-1 a la región FR del anticuerpo humano de número de registro U96396. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos se diseñó para la región variable de cadena ligera del anticuerpo humanizado (SEQ ID NO: 55). En lo sucesivo en el presente documento, la abreviatura "FA19RKA" se usa para la cadena ligera humanizada.

Por otro lado, la CDR2 de cadena ligera de FA19-1 contiene una cisteína. Esto puede causar un problema de estabilidad del anticuerpo debido a agregación o similar. Por lo tanto, también se diseñó una variante por sustitución de la serina, que se adopta en la línea germinal de ratón, para la cisteína en el anticuerpo FA19-1 humanizado diseñado como se ha descrito anteriormente. HTCTLQP (SEQ ID NO: 57) en la CDR2 de cadena ligera FA19-1 se convirtió en HTSTLQP (SEQ ID NO: 72) en la de la cadena ligera de CDR2 sustituida con serina. En lo sucesivo en el presente documento, la cadena ligera modificada se denomina "cadena ligera sustituida con serina".

Para construir los genes para la región variable de cadena pesada y de cadena ligera de anticuerpo humanizado, se diseñaron oligo ADN sintéticos de aproximadamente 50 nucleótidos para que fueran capaces de hibridarse entre sí en una región de aproximadamente 20 nucleótidos. Los oligo ADN sintéticos se ensamblaron en conjunto por PCR para preparar los genes que codificaban cada región variable. Después de escisión en el sitio *HindIII* de restricción enzimática en el extremo en la posición 5' del oligo ADN sintético y en el sitio *XhoI* (RHA) o *BsiWI* (RKA; cadena ligera sustituida con serina) en el extremo en la posición 3' del oligo ADN sintético, cada uno de los ADN digeridos se insertaron en un vector pEE6.4 que portaba la región constante de IgG1 humana o un vector pEE14.4 que portaba la región constante de cadena κ humana, siendo ambos de Lonza.

Con un método convencional que usa lipofectamina 2000, las células 293T se cotransfectaron usando los vectores de extensión construidos para cadena ligera sustituida con serina, FA19RHA, y FA19RKA en las combinaciones de FA19RHA y FA19RKA, y FA19RHA y cadena ligera sustituida con serina. Después de 48 horas, los sobrenadantes del cultivo se recogieron y las concentraciones de IgG en los sobrenadantes del cultivo se determinaron mediante ELISA de sándwich usando un anticuerpo anti-IgG humano de una cabra, específico de fragmento de Fc γ (Strattech Scientific) y conjugado de peroxidasa de cadena ligera kappa anti-humano de cabra (Sigma). Las concentraciones se calcularon a partir de una curva patrón preparada usando IgG humana purificada (Cappel) disponible en el mercado.

Usando los sobrenadantes del cultivo cuyas concentraciones de IgG se habían determinado, se evaluaron las actividades de anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, y anticuerpo humanizado sustituido con serina y se compararon mediante ELISA para la proteína purificada del of el dominio extracelular de CLCP1 que se ha descrito en el Ejemplo 21. El resultado mostraba que la actividad era comparable entre el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado sustituido con serina, y entre el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humanizado sustituido con serina. Por lo tanto, el FA19-1 humanizado se diseñó de forma satisfactoria (Figs. 42 y 43).

[Ejemplo 28] Tratamiento del tumor con anticuerpo monoclonal y su efecto de supresión de crecimiento y metástasis de células cancerosas

Las células H460-LNM35 se trasplantaron a ratones atímicos KSN/slc (obtenidos en Japan SLC, Inc.) bajo la piel en la región inguinal izquierda. A continuación, un anticuerpo se administró a los ratones, y esto se controló para metástasis en el pulmón y en los ganglios linfáticos. Cada grupo contenía cuatro ratones. La dosis era 10 $\mu\text{g/g}$ (BW) y el número de veces de la administración era 10.

El volumen del tumor trasplantado se midió el día 10 (diez días) después del trasplante de células H460-LNM35 (5×10^6 células). Los ratones con los volúmenes tumorales más próximos se seleccionaron y se dividieron en tres grupos cada uno conteniendo cuatro (Fig. 15A).

Del 10 al día 37 (de diez a 37 días después del trasplante), un anticuerpo se administró una vez cada tres días durante un total de diez veces (10 $\mu\text{g/g}$ (BW)). El día 46 (46 días después del trasplante), los ratones se sacrificaron para medir el peso corporal, volumen tumoral, y peso del tumor. El análisis estadístico usado fue el ensayo de t para el peso corporal, volumen tumoral, y peso del tumor, o ensayo de U de Mann-Whitney para el número de sitios de metástasis de pulmón y peso del ganglio linfático.

El volumen tumoral se muestra en la Fig. 15A-D. En la Fig. 16 se muestran diversos pesos (peso corporal excluyendo el peso del tumor, peso del tumor, ganglio linfático retroperitoneal, ganglio linfático axilar ipsilateral, y ganglio linfático inguinal contralateral) y el número de ganglios metastásicos de pulmón en el momento del sacrificio.

Con respecto al efecto terapéutico frente al tumor, la administración de FA19-1 presentaba una tendencia de supresión del crecimiento del tumor en comparación con el grupo de IgG de control. Había una diferencia significativa el día 34 (34 días después del trasplante). Sin embargo, no se observaba diferencia significativa el día 41 (41 días después del trasplante).

Por otro lado, FA17-9 presentaba una tendencia de supresión del crecimiento del tumor en cierta medida el día 34 (34 días después del trasplante). Sin embargo, no había diferencia en el efecto en el día 41 (41 días después del trasplante). Parecía que el peso en el momento del sacrificio era más pesado que el del control; sin embargo, no había diferencia significativa. Además, la tasa de crecimiento era elevada después de la finalización de la administración del anticuerpo FA17-9 (los datos no se muestran).

El efecto de supresión de la metástasis de células cancerosas se resume como sigue a continuación. Se demostraba administración de FA19-1 suprimía la metástasis de forma significativa, en particular, la metástasis de pulmón. FA17-9 también presenta una tendencia de supresión de la metástasis, aunque el efecto era más débil en comparación con FA19-1 (Fig. 16C). Además, en los grupos administrados con FA19-1 o FA17-9 (Fig. 16D-F), la ampliación de los linfáticos de vida a la metástasis apenas se observaba en ningún ganglio linfático. Sin embargo, no había diferencia significativa debido a variación en el grupo de administración de anticuerpo de control.

La administración del anticuerpo no debilitaba ningún animal. No se produjo cambio en el peso corporal excluyendo el peso del tumor (Fig. 16A).

De forma específica, este experimento demostraba que estos anticuerpos tenían la actividad de inhibición del crecimiento celular, además de la actividad de inhibición de la metástasis.

Los datos sobre la supresión de la metástasis con FA17-9 o FA19-1, en particular, supresión de metástasis de pulmón, eran altamente reproducibles. Además, los datos obtenidos demostraban que la administración de 6AA_17-2 también suprimía la metástasis de pulmón (Fig. 26).

[Ejemplo 29] Identificación del sitio reconocido por los anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales FA19-1, 6AA_17-2, EC6-8, y FA17-9 se examinaron por sus sitios de reconocimiento en CLCP1. FA17-9 es altamente homólogo a FA19-1 tanto en la cadena pesada como en la cadena ligera y su uso es el mismo. Por lo tanto, se supone que los sitios reconocidos por los mismos son idénticos. Por esta razón, FA17-9 se excluyó del procedimiento de estrechamiento de los sitios de reconocimiento.

En primer lugar, para estrechar los sitios de reconocimiento, las proteínas recombinantes que corresponden a las propinas de aa 195 - aa 492 (aa: resto de aminoácido) y aa 195 - aa 453 en la SEQ ID NO: 2 se produjeron en *E. coli*. La reactividad de cada anticuerpo con respecto a las proteínas se evaluó mediante ELISA. Para producir las proteínas recombinantes en *E. coli*, que corresponden a aa 195 - aa 492 y aa 195 - aa 453 en la SEQ ID NO: 2, *E. coli* se construyeron vectores de expresión. De forma específica, se amplificaron fragmentos de CLCP1 parcial mediante PCR usando los cebadores que se describen a continuación. Los fragmentos se digirieron con *EcoRI* y *Sall*, y a continuación se inserta en pET28a entre los sitios *EcoRI* y *XhoI*. BL21 se transformó con los vectores de extensión construidos. La expresión se indujo con IPTG 1 mM. Las fracciones insolubles se solubilizaron con Urea 8 M. Las proteínas se purificaron usando la columna TALON.

Cebador en la posición 5' común: CGGAATTCTGTTTGGACTGCATCC (SEQ ID NO: 73)

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 492: ACGCGTCGACTGGTTGCGTAAATTTTGG (SEQ ID NO: 74)

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 453: ACGCGTCGACAGGAATAAACTGACATCC (SEQ ID NO: 75). Los sitios de escisión de *EcoRI* y *Sall* están subrayados.

Cada anticuerpo se evaluó mediante ELISA usando las proteínas purificadas preparadas como se ha descrito anteriormente. Como un control también se usó una proteína recombinante del dominio extracelular completo producida en *E. coli*. El resultado mostraba que los tres tipos de anticuerpos sometidos a ensayo eran reactivos a la proteína recombinante producida por *E. coli* que corresponde a los aa 195 - aa 492 en la SEQ ID NO: 2 pero no a la proteína recombinante producida por *E. coli* que corresponde a los aa 195 - aa 453 (Fig. 27). Esto sugiere que los sitios reconocidos por los anticuerpos están situados dentro de la región de aa 454 - aa 492 en la SEQ ID NO: 2, que solamente existen en la proteína purificada de aa 195 - aa 492 en la SEQ ID NO: 2.

A continuación, se prepararon cuatro proteínas que comienzan a partir de aa 195 en la SEQ ID NO: 2 en el lado N terminal, y se diferencian entre sí en el extremo C terminal para estrechar adicionalmente los sitios de reconocimiento. Las proteínas respectivas corresponden a las regiones de aa 195 - aa 469, aa 195 - aa 465, aa 195 - aa 461, y aa 195 - aa 457 en la SEQ ID NO: 2. Las proteínas se produjeron y se purificaron con el mismo método que se ha descrito usando el sistema de expresión de pET28a. Los cebadores en la posición 3' usados se muestran a continuación. El cebador en la posición 5' usado era el mismo que el cebador en la posición 5' común mostrado anteriormente.

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 469: ACGCGTCGACTGCTGTTCCGAGGAGGTGG (SEQ ID NO: 76)

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 465: ACGCGTCGACAGGTTGAGGTTGAGTAAG (SEQ ID NO: 77)

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 461: ACGCGTCGACAGTAAGTTTGGAGGACG (SEQ ID NO: 78)

Cebador en la posición 3' de aa 195 - aa 457: ACGCGTCGACAGGACGACCTTTAGGAAT (SEQ ID NO: 79). El sitio de escisión de *Sall* está subrayado.

Cada anticuerpo se evaluó mediante ELISA usando las proteínas purificadas preparadas como se ha descrito anteriormente. El resultado en FA19-1, 6AA_17-2, y EC6-8 se muestran las Figs. 28, 29, y 30. También se usaron las proteínas purificadas que corresponden a aa 195 - aa 492 y aa 195 - aa 453 en la SEQ ID NO: 2, preparadas en el proceso de estrechamiento que se ha descrito anteriormente.

5 FA19-1 era reactivo para la proteína purificada de aa 195 - aa 469 en la SEQ ID NO: 2, pero no para la proteína de aa 195 - aa 465 y las proteínas más pequeñas (Fig. 28). Sin embargo, parecía que la reactividad será ligeramente más débil que la de para aa 195 -aa 492. Por lo tanto, se sospechaba que la secuencia cerca de aa 465 en la SEQ ID NO: 2 tenía una influencia en la unión al anticuerpo. Por otro lado, la absorbancia en presencia de cualquier proteína distinta de las que se han descrito anteriormente era comparable con aquella en ausencia de un anticuerpo. Por lo tanto, se demostró que FA19-1 no era reactivo para las proteínas.

15 6AA_17-2 era reactivo para aa 195 - aa 465 en la SEQ ID NO: 2 pero no para aa 195 - aa 461. Esto sugiere que la unión requiere al menos la secuencia de aa 461 - aa 465 en la SEQ ID NO: 2 (Fig. 29).

EC6-8 era reactivo para aa 195 - aa 461 en la SEQ ID NO: 2 pero en absoluto para aa 195 - aa 457. Esto sugiere que la unión requiere al menos la secuencia de aa 457 - aa 461 en la SEQ ID NO: 2 (Fig. 30).

20 A continuación, se insertaron secuencias parciales de CLCP1 en pGEX4T-1, un vector de expresión para proteína de fusión de GST, para producir proteínas recombinantes en *E. coli*. La actividad de unión con respecto a las proteínas recombinantes se analizó por ELISA para identificar de forma más precisa los sitios reconocidos por FA17-9, FA19-1, 6AA_17-2, y EC6-8. Las cuatro secuencias parciales insertadas fueron: aa 451 - aa 460 (en lo sucesivo en el presente documento GST451-60), aa 456 - aa 465 (en lo sucesivo en el presente documento GST456-65), aa 461 - aa 470 (en lo sucesivo en el presente documento GST461-70), y aa 466 - aa 475 (en lo sucesivo en el presente documento GST466-75) en la SEQ ID NO: 2. Estos genes que codifican estas secuencias, que se insertaron en pGEX4T-1, se prepararon por PCR usando los siguientes cebadores:

Cebador GST451-60/F1: cgtcctccaaaacttgaagatctctcgagCGGCCGCATCGTGACTGACTGACG (SEQ ID NO: 80)

Cebador GST451-60/F2: CGGGATCCTTTATTCCCTAAAGGTcgtcctccaaaacttgaagatctctcgag (SEQ ID NO: 81)

30 Cebador GST456-65/F1: actcaacctccaccttgaagatctctcgagCGGCCGCATCGTGACTGACTGACG (SEQ ID NO: 82)

Cebador GST456-65/F2: CGGGATCCCCTCCTCCAAAACCTactcaacctccaccttgaagatctctcgag (SEQ ID NO: 83)

Cebador GST461-70/F1: cctcggaacagcaattgaagatctctcgagCGGCCGCATCGTGACTGACTGACG (SEQ ID NO: 84)

Cebador GST461-70/F2: CGGGATCCACTCAACCTCCACCTcctcggaacagcaattgaagatctctcgag (SEQ ID NO: 85)

35 Cebador GST466-75/F1: gacctcaaaaacacttgaagatctctcgagCGGCCGCATCGTGACTGACTGACG (SEQ ID NO: 86)

Cebador GST466-75/F2: CGGGATCCCCTCGGAACAGCAATgacctcaaaaacacttgaagatctctcgag (SEQ ID NO: 87)

Cebador de GST-péptido /R: AACTGCAGGCATCGTGTTGTCACGCTCGTC (SEQ ID NO: 88). Los sitios *Bam*HI y *Pst*I están subrayados.

40 Las letras en minúsculas indican la secuencia de hibridación en el cebador F1 o F2. La secuencia que comienza desde el sitio *Bam*HI en la posición 5' en el cebador F2 hasta el extremo la posición 3' del cebador F1 codifica un CLCP1 parcial.

45 Usando pGEX4T-1 como un molde, la región *Bam*HI-*Pst*I de pGEX4T-1 que contenía adicionalmente una porción del gen que codificaba la secuencia parcial se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores: cebador F1 que corresponde a cada secuencia parcial y cebador de GST-péptido/R que contenía la secuencia de escisión *Pst*I de pGEX4T-1. A continuación, usando el fragmento amplificado como molde, el fragmento *Bam*HI-*Pst*I que contenía adicionalmente toda la secuencia parcial al insertar se amplificó por PCR con un conjunto de cebadores: cebador F2 que corresponde a cada secuencia parcial y cebador de GST-péptido/R. El producto final se digirió con *Bam*HI y *Pst*I, y se substituyó para la región *Bam*HI-*Pst*I en pGEX4T-1 para construir un vector de expresión para cada proteína de fusión de GST. BL21 se transformó con los vectores de expresión resultantes. La expresión se indujo con IPTG 1 mM. Las proteínas de fusión de GST se purificaron a partir de las fracciones solubles usando una columna de glutatión.

55 FA17-9, FA19-1, 6AA_17-2, y EC6-8 se evaluaron mediante ELISA usando las diversas proteínas de fusión de GST preparadas para evaluar sus actividades de unión. El resultado mostraba que the FA17-9 y FA19-1 eran reactivos para GST461-70 mientras que 6AA_17-2 era reactivo para GST456-65 (Fig. 44). EC6-8 presentaba una fuerte actividad de unión para GST451-60 pero débil reactividad para GST456-65.

60 (Sitios reconocidos por FA19-1 y FA17-9)

65 El resultado mostrado en la Fig. 28 indica que el sitio de reconocimiento está situado en aa 454 - aa 469 y una región pequeña inmediatamente adyacente a su lado C terminal. El resultado mostrado en la Fig. 44 demuestra que los dos anticuerpos eran suficientemente reactivos para aa 461 - aa 470 pero no se unen a otras regiones (la absorbancia es comparable con el nivel del fondo con otros péptidos). En conjunto, el sitio de reconocimiento está

situado en aa 461 - aa 470 en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, los anticuerpos se pueden definir como anticuerpos aislados que se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2, pero no se unen a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2.

(Sitio reconocido por 6AA_17-2)

El resultado mostrado en la Fig. 29 indica que el sitio de reconocimiento está situado dentro de aa 454 - aa 465 en la SEQ ID NO: 2. El resultado mostrado en la Fig. 44 demuestra que 6AA_17-2 es altamente reactivo para aa 456 - aa 465 dentro de la región de aa 454 - aa 465 pero no se une a otras regiones (la absorbancia es comparable con el nivel del fondo con otros péptidos). Por lo tanto, el sitio de reconocimiento por el anticuerpo está situado en aa 456 - aa 465 en la SEQ ID NO: 2. Como alternativa, el anticuerpo se puede definir como un anticuerpo aislado que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2, pero no se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2, y un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2.

(Sitio reconocido por EC6-8)

El resultado mostrado en la Fig. 30 demuestra que el sitio de reconocimiento está situado dentro de aa 454 - aa 461 en la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo es altamente reactivo para aa 451 - aa 460, como se observa en la Fig. 44. El anticuerpo no es reactivo para aa 461 - aa 470. Por lo tanto, se supone que el sitio reconocido por el anticuerpo está situado en el sitio común aa 454 - aa 460. Como alternativa, el anticuerpo se puede definir como un anticuerpo aislado que se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 465 en la SEQ ID NO: 2 pero no se une a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2.

Los resultados que se han descrito anteriormente se resumen en un diagrama en la Fig. 32. Los sitios reconocidos por los tres anticuerpos (FA19-1, FA17-9, y 6AA_17-2), que se demostró que tenían actividad de supresión de metástasis, están situados dentro de aa 456 - aa 470. Por lo tanto, aa 456 - aa 470 de CLCP1 (SEQ ID NO: 2) es una secuencia esencial como un sitio de unión para anticuerpos con actividad de supresión de metástasis.

Aplicabilidad Industrial

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpo de la presente invención se unen a CLCP1 humano y tienen la actividad de inhibición de migración, invasión, metástasis, o crecimiento celular, y/o actividad citotóxica. En otro aspecto, los anticuerpos tienen ADCC con respecto a células cancerosas. Por lo tanto, se espera en muy gran medida que los anticuerpos de la presente invención se puedan aplicar en el tratamiento de enfermedades cancerosas tales como tumor maligno.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MEDICAL AND BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. ONCOMICS CO., LTD.

<120> Anticuerpos contra dominios extracelulares de CLCP1 humano y su uso

<130> M3-A0804P

<150> JP 2008-185305

<151> 16-07-2008

<160> 88

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 2328

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 613 841 T3

atggcgagcc gggcggtggt gagagccagg cgctgcccgc agtgtcccca agtccgggcc 60
 ggggcccgcg cccccgcctg ggccgcgctc cccctctccc gctccctccc tccctgctcc 120
 aactcctcct ccttctccat gcctctgttc ctctgctct tacttgctct gctcctgctg 180
 ctcgaggacg ctggagccca gcaaggatgat ggatgtggac aactgtact aggcctgag 240
 agtggaaacc ttacatccat aaactaccca cagacctatc ccaacagcac tgtttgtaa 300
 tgggagatcc gtgtaaagat gggagagaga gttcgcatca aatttggatga ctttgacatt 360
 gaagattctg attctgtgca ctttaattac ttgagaattt ataatggaat tggagtcagc 420
 agaactgaaa taggcaaata ctgtggtctg gggttgcaaa tgaaccattc aattgaatca 480
 aaaggcaatg aatcacatt gctgttcatg agtggaatcc atgtttctgg acgcgattt 540
 ttggcctcat actctgttat agataaacia gatctaatta cttgtttgga cactgcatcc 600
 aatttttttg aacctgagtt cagtaagtac tgcccagctg gttgtctgct tccctttgct 660
 gagatatctg gaacaattcc tcatggatat agagattcct cgccattgtg catggctggt 720
 gtgcatgcag gagtagtgtc aaacacgttg ggcggccaaa tcagtgttgt aattagtaaa 780
 ggtattocct attatgaaag ttctttggct aacaacgtca catctgtggt gggacactta 840
 totacaagtc tttttacatt taagacaagt ggatgttatg gaacactggg gatggagtct 900
 ggtgtgatcg cggatcctca aataacagca tcatctgtgc tggagtggac tgaccacaca 960
 gggcaagaga acagttggaa acccaaaaaa gccaggctga aaaaacctgg accgccttgg 1020
 gctgcttttg cactgatga ataccagtgg ttacaaatag attgaataa ggaaaagaaa 1080
 ataacaggca ttataaccac tggatccacc atggtggagc acaattacta tgtgtctgcc 1140

ES 2 613 841 T3

tacagaatcc tgtacagtga tgatgggcag aatggactg tgtacagaga gcctgggtgtg 1200
gagcaagata agatatttca aggaaacaaa gattatcacc aggatgtgcg taataacttt 1260
ttgccaccaa ttattgcacg ttttattaga gtgaatccta cccaatggca gcagaaaatt 1320
gccatgaaaa tggagctgct cggatgtcag tttattccta aaggtoctcc tccaaaactt 1380
actcaacctc cacctctctg gaacagcaat gacctcaaaa acactacagc cctccaaaa 1440
atagccaaag gtctgtcccc aaaatttacg caaccactac aacctcgcag tagcaatgaa 1500
tttctgcac agacagaaca aacaactgcc agtcttgata tcagaaatac taccgtaact 1560
ccaaatgtaa ccaaagatgt agcgtggct gcagttcttg tcctgtgct ggtcatggtc 1620
ctcactactc tcattctcat attagtgtgt gcttggcact ggagaaacag aaagaaaaaa 1680
actgaaggca cctatgactt accttactgg gaccgggcag gttggtggaa aggaatgaag 1740
cagtttcttc ctgcaaaagc agtggaccat gaggaacccc cagttcgtta tagcagcagc 1800
gaagttaatc acctgagtc aagagaagtc accacagtgc tgcaggctga ctctgcagag 1860
tatgctcagc cactggtagg aggaattggt ggtacacttc atcaaagatc tacctttaa 1920
ccagaagaag gaaaagaagc aggctatgca gacctagatc cttacaactc accagggcag 1980
gaagtttatc atgcctatgc tgaaccactc ccaattacgg ggctgagta tgcaacccca 2040
atcatcatgg acatgtcagg gcaccccaca acttcagttg gtcagcctc cacatccact 2100
ttcaaggcta cggggaacca acctcccca ctagtgggaa cttacaatac acttctctcc 2160
aggactgaca gctgctcctc agcccaggcc cagtatgata ccccgaaagc tgggaagcca 2220
ggtctacctg cccagacga attggtgtac caggtgccac agagcacaca agaagtatca 2280
ggagcaggaa gggatgggga atgtgatgtt ttaaagaaa tcctttga 2328

<210> 2
<211> 775
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Met Ala Ser Arg Ala Val Val Arg Ala Arg Arg Cys Pro Gln Cys Pro
1 5 10 15

Gln Val Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Trp Ala Ala Leu Pro Leu
20 25 30

Ser Arg Ser Leu Pro Pro Cys Ser Asn Ser Ser Ser Phe Ser Met Pro
35 40 45

Leu Phe Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Glu Asp Ala

10

ES 2 613 841 T3

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

ES 2 613 841 T3

Asp Pro Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp Thr Asp His Thr
 305 310 315 320
 Gly Gln Glu Asn Ser Trp Lys Pro Lys Lys Ala Arg Leu Lys Lys Pro
 325 330
 Gly Pro Pro Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu Tyr Gln Trp Leu Gln
 340 345 350
 Ile Asp Leu Asn Lys Glu Lys Lys Ile Thr Gly Ile Ile Thr Thr Gly
 355 360 365
 Ser Thr Met Val Glu His Asn Tyr Tyr Val Ser Ala Tyr Arg Ile Leu
 370 375 380
 Tyr Ser Asp Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val Tyr Arg Glu Pro Gly Val
 385 390 395 400
 Glu Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr His Gln Asp Val
 405 410 415
 Arg Asn Asn Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe Ile Arg Val Asn
 420 425 430
 Pro Thr Gln Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Met Glu Leu Leu Gly
 435 440 445
 Cys Gln Phe Ile Pro Lys Gly Arg Pro Pro Lys Leu Thr Gln Pro Pro
 450 455 460
 Pro Pro Arg Asn Ser Asn Asp Leu Lys Asn Thr Thr Ala Pro Pro Lys
 465 470 475 480
 Ile Ala Lys Gly Arg Ala Pro Lys Phe Thr Gln Pro Leu Gln Pro Arg
 485 490 495
 Ser Ser Asn Glu Phe Pro Ala Gln Thr Glu Gln Thr Thr Ala Ser Pro
 500 505 510
 Asp Ile Arg Asn Thr Thr Val Thr Pro Asn Val Thr Lys Asp Val Ala
 515 520 525
 Leu Ala Ala Val Leu Val Pro Val Leu Val Met Val Leu Thr Thr Leu
 530 535 540

ES 2 613 841 T3

Ile Leu Ile Leu Val Cys Ala Trp His Trp Arg Asn Arg Lys Lys Lys
545 550 555 560

Thr Glu Gly Thr Tyr Asp Leu Pro Tyr Trp Asp Arg Ala Gly Trp Trp
565 570 575

Lys Gly Met Lys Gln Phe Leu Pro Ala Lys Ala Val Asp His Glu Glu
580 585 590

Thr Pro Val Arg Tyr Ser Ser Ser Glu Val Asn His Leu Ser Pro Arg
595 600 605

Glu Val Thr Thr Val Leu Gln Ala Asp Ser Ala Glu Tyr Ala Gln Pro
610 615 620

Leu Val Gly Gly Ile Val Gly Thr Leu His Gln Arg Ser Thr Phe Lys
625 630 635 640

Pro Glu Glu Gly Lys Glu Ala Gly Tyr Ala Asp Leu Asp Pro Tyr Asn
645 650 655

Ser Pro Gly Gln Glu Val Tyr His Ala Tyr Ala Glu Pro Leu Pro Ile
660 665 670

Thr Gly Pro Glu Tyr Ala Thr Pro Ile Ile Met Asp Met Ser Gly His
675 680 685

Pro Thr Thr Ser Val Gly Gln Pro Ser Thr Ser Thr Phe Lys Ala Thr
690 695 700

Gly Asn Gln Pro Pro Pro Leu Val Gly Thr Tyr Asn Thr Leu Leu Ser
705 710 715 720

Arg Thr Asp Ser Cys Ser Ser Ala Gln Ala Gln Tyr Asp Thr Pro Lys
725 730 735

Ala Gly Lys Pro Gly Leu Pro Ala Pro Asp Glu Leu Val Tyr Gln Val
740 745 750

Pro Gln Ser Thr Gln Glu Val Ser Gly Ala Gly Arg Asp Gly Glu Cys
755 760 765

Asp Val Phe Lys Glu Ile Leu
770 775

<210> 3
<211> 526

ES 2 613 841 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

5

Met Ala Ser Arg Ala Val Val Arg Ala Arg Arg Cys Pro Gln Cys Pro
 1 5 10 15

Gln Val Arg Ala Ala Ala Ala Ala Pro Ala Trp Ala Ala Leu Pro Leu
 20 25 30

Ser Arg Ser Leu Pro Pro Cys Ser Asn Ser Ser Ser Phe Ser Met Pro
 35 40 45

Leu Phe Leu Leu Leu Leu Leu Val Leu Leu Leu Leu Leu Glu Asp Ala
 50 55 60

Gly Ala Gln Gln Gly Asp Gly Cys Gly His Thr Val Leu Gly Pro Glu
 65 70 75 80

Ser Gly Thr Leu Thr Ser Ile Asn Tyr Pro Gln Thr Tyr Pro Asn Ser
 85 90 95

Thr Val Cys Glu Trp Glu Ile Arg Val Lys Met Gly Glu Arg Val Arg
 100 105 110

Ile Lys Phe Gly Asp Phe Asp Ile Glu Asp Ser Asp Ser Cys His Phe
 115 120 125

Asn Tyr Leu Arg Ile Tyr Asn Gly Ile Gly Val Ser Arg Thr Glu Ile
 130 135 140

Gly Lys Tyr Cys Gly Leu Gly Leu Gln Met Asn His Ser Ile Glu Ser
 145 150 155 160

Lys Gly Asn Glu Ile Thr Leu Leu Phe Met Ser Gly Ile His Val Ser
 165 170 175

Gly Arg Gly Phe Leu Ala Ser Tyr Ser Val Ile Asp Lys Gln Asp Leu
 180 185 190

Ile Thr Cys Leu Asp Thr Ala Ser Asn Phe Leu Glu Pro Glu Phe Ser
 195 200 205

Lys Tyr Cys Pro Ala Gly Cys Leu Leu Pro Phe Ala Glu Ile Ser Gly
 210 215 220

ES 2 613 841 T3

Thr Ile Pro His Gly Tyr Arg Asp Ser Ser Pro Leu Cys Met Ala Gly
 225 230 235 240
 Val His Ala Gly Val Val Ser Asn Thr Leu Gly Gly Gln Ile Ser Val
 245 250 255
 Val Ile Ser Lys Gly Ile Pro Tyr Tyr Glu Ser Ser Leu Ala Asn Asn
 260 265 270
 Val Thr Ser Val Val Gly His Leu Ser Thr Ser Leu Phe Thr Phe Lys
 275 280 285
 Thr Ser Gly Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu Ser Gly Val Ile Ala
 290 295 300
 Asp Pro Gln Ile Thr Ala Ser Ser Val Leu Glu Trp Thr Asp His Thr
 305 310 315 320
 Gly Gln Glu Asn Ser Trp Lys Pro Lys Lys Ala Arg Leu Lys Lys Pro
 325 330 335
 Gly Pro Pro Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu Tyr Gln Trp Leu Gln
 340 345 350
 Ile Asp Leu Asn Lys Glu Lys Lys Ile Thr Gly Ile Ile Thr Thr Gly
 355 360 365
 Ser Thr Met Val Glu His Asn Tyr Tyr Val Ser Ala Tyr Arg Ile Leu
 370 375 380
 Tyr Ser Asp Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val Tyr Arg Glu Pro Gly Val
 385 390 395 400
 Glu Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp Tyr His Gln Asp Val
 405 410 415
 Arg Asn Asn Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg Phe Ile Arg Val Asn
 420 425 430
 Pro Thr Gln Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met Lys Met Glu Leu Leu Gly
 435 440 445
 Cys Gln Phe Ile Pro Lys Gly Arg Pro Pro Lys Leu Thr Gln Pro Pro
 450 455 460

ES 2 613 841 T3

Pro Pro Arg Asn Ser Asn Asp Leu Lys Asn Thr Thr Ala Pro Pro Lys
465 470 475 480

Ile Ala Lys Gly Arg Ala Pro Lys Phe Thr Gln Pro Leu Gln Pro Arg
485 490 495

Ser Ser Asn Glu Phe Pro Ala Gln Thr Glu Gln Thr Thr Ala Ser Pro
500 505 510

Asp Ile Arg Asn Thr Thr Val Thr Pro Asn Val Thr Lys Asp
515 520 525

<210> 4
<211> 243
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

Leu Phe Thr Phe Lys Thr Ser Gly Cys Tyr Gly Thr Leu Gly Met Glu
1 5 10 15

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

Trp Thr Asp His Thr Gly Gln Glu Asn Ser Trp Lys Pro Lys Lys Ala
35 40 45

Arg Leu Lys Lys Pro Gly Pro Pro Trp Ala Ala Phe Ala Thr Asp Glu
50 55 60

Tyr Gln Trp Leu Gln Ile Asp Leu Asn Lys Glu Lys Lys Ile Thr Gly
65 70 75 80

Ile Ile Thr Thr Gly Ser Thr Met Val Glu His Asn Tyr Tyr Val Ser
85 90 95

Ala Tyr Arg Ile Leu Tyr Ser Asp Asp Gly Gln Lys Trp Thr Val Tyr
100 105 110

Arg Glu Pro Gly Val Glu Gln Asp Lys Ile Phe Gln Gly Asn Lys Asp
115 120 125

Tyr His Gln Asp Val Arg Asn Asn Phe Leu Pro Pro Ile Ile Ala Arg
130 135 140

Phe Ile Arg Val Asn Pro Thr Gln Trp Gln Gln Lys Ile Ala Met-Lys

10

ES 2 613 841 T3

145 150 155 160

Met Glu Leu Leu Gly Cys Gln Phe Ile Pro Lys Gly Arg Pro Pro Lys
 165 170 175

Leu Thr Gln Pro Pro Pro Pro Arg Asn Ser Asn Asp Leu Lys Asn Thr
 180 185 190

Thr Ala Pro Pro Lys Ile Ala Lys Gly Arg Ala Pro Lys Phe Thr Gln
 195 200 205

Pro Leu Gln Pro Arg Ser Ser Asn Glu Phe Pro Ala Gln Thr Glu Gln
 210 215 220

Thr Thr Ala Ser Pro Asp Ile Arg Asn Thr Thr Val Thr Pro Asn Val
 225 230 235 240

Thr Lys Asp

5 <210> 5
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 5

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact acctatgta tgcaactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcaa ggccacactg acttcagaca aatcctccag cacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgoggtct attactgtgc aagagggggcc 300
 aattactacg gtagtagcta caactgggcc ttcgatgtct ggggagcagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

10

15 <210> 6
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 6

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

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

ES 2 613 841 T3

Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Asn Trp Ser Phe Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

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

<400> 7

10 Thr Tyr Val Met His
 1 5

15 <210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 8

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

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

<400> 9

Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Asn Trp Ser Phe Asp Val
 1 5 10 15

30 <210> 10
 <211> 309
 <212> ADN

ES 2 613 841 T3

<213> *Mus musculus*

<400> 10

```

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc      60
atcacttgca aggcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct      120
ggagaaggtc ctaggctact catacattac acatctacat tacagccagg catcccatca      180
aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct      240
gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgattatc tgtggacggt cggaggaggc      300
5 accaagctg                                                                309

```

<210> 11

<211> 103

<212> PRT

10 <213> *Mus musculus*

<400> 11

```

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

```

15

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

20 <213> *Mus musculus*

<400> 12

```

Lys Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
1           5           10

```

ES 2 613 841 T3

<210> 13
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 13

Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Trp Thr
 1 5

10 <210> 14
 <211> 372
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 14

gagggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggata cacattcact acctatatta tgcaactgggt gaagcagaag 120
 cctgggcagg gccttgagtg gattggatat attaatcctt acaatgatgg tactaagtac 180
 aatgagaagt tcaaaggcga ggccacactg acttcagaca aatcctccag tacagcctac 240
 atggagctca gcagcctgac ctctgaggac tctgcgggtct attactgtgc aagagggggcc 300
 aattactacg gtagtaacta caactgggtcc ttcgatgtct ggggcgcagg gaccacggtc 360
 accgtctcct ca 372

20 <210> 15
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 15

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

ES 2 613 841 T3

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Asn Trp Ser Phe Asp
 100 105 110

Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 16
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 16

10 Thr Tyr Ile Met His
 1 5

15 <210> 17
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 17

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

20 Gly
 <210> 18
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25 <400> 18

Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Asn Trp Ser Phe Asp Val
 1 5 10 15

30 <210> 19
 <211> 309
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 35 <400> 19

gacatccaga tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctctgggagg caaagtcacc 60

ES 2 613 841 T3

atcacttgca gggcaagcca agacattaac aagtatatag cttggtacca acacaagcct 120
 ggaaaagggtc ctaggctgct catacatcac acatgtacat tacagccagg catcccatca 180
 aggttcagtg gaagtgggtc tgggagagat tattccttca gcatcagcaa cctggagcct 240
 gaagatattg caacttatta ttgtctacag tatgattatc tgtggacggt cgggtggaggc 300
 accaagctg 309

5 <210> 20
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 20

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

10 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 21

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr Ile Ala
 1 5 10

20 <210> 22
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 22

ES 2 613 841 T3

Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Trp Thr
1 5

5 <210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 23

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15 <210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <400> 24
ctatgcaggc agactgccgg c 21

25 <210> 25
<211> 27
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 25
cccaagcttt gcaggcagac tgccggc 27

35 <210> 26
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial

40 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 26
cgaggtacca aggatttctt taaaacatc acat 34

45 <210> 27
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial

50 <220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 27

55 Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Ala Ala
20

ES 2 613 841 T3

<210> 28
 <211> 63
 <212> ADN
 5 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia de nucleótidos sintetizada artificialmente

 10 <400> 28

 atgagggtcctt tgctaatacctt ggtgctttgc ttcttgcccc tggtctgctct gggggcggcc 60

 gcc 63

 <210> 29
 <211> 33
 <212> ADN
 15 <213> Artificial

 <220>
 20 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

 <400> 29
 aatagcggcc gcaccatggc gagccgggcg gtg 33

 25 <210> 30
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial

 30 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

 <400> 30
 acgcgtcgac aaggatttct ttaaaaacat cacattc 37
 35
 <210> 31
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

 <400> 31
 45 acgcgtcgac tacatctttg gttacattg gag 33

 <210> 32
 <211> 36
 <212> ADN
 50 <213> Artificial

 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

 <400> 32
 55 aatagcggcc gctctttta catttaagac aagtgg 36

 <210> 33
 <211> 23
 60 <212> ADN
 <213> Artificial

ES 2 613 841 T3

<220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 33
 5 cgactggagc acgaggacac tga 23

<210> 34
 <211> 19
 <212> ADN
 10 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 34
 15 aattttcttg tccacctgg 19

<210> 35
 <211> 26
 20 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 35
 25 ctaaacactca ttctgttga agctct 26

<210> 36
 <211> 30
 30 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 36
 35

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

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

<210> 37
 <211> 14
 40 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 37

	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly
	1				5					10				

<210> 38
 <211> 32
 50 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 38

ES 2 613 841 T3

Glu Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

5 <210> 39
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 39

10 Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

15 <210> 40
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

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

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

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

Gly Trp Ile Asn Thr Ala Ser Ala Asn Thr Lys Cys Ser Gln Asn Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Cys Ser Gly Asp Thr Cys Tyr Gln Gly Ser Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

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

25 <210> 41
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 41

ES 2 613 841 T3

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

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

5 <210> 42
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 42

10 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

15 <210> 43
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 43

Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr Met Glu
 1 5 10 15

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

25 <210> 44
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 44

30 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

30 <210> 45
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Una secuencia de aminoácidos sintetizada artificialmente

<400> 45

ES 2 613 841 T3

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

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Val Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Ala Asn Tyr Tyr Gly Ser Asn Tyr Asn Trp Ser Phe Asp
 100 105 110

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

5 <210> 46
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 46

10 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gly Lys Val Thr Ile Thr Cys
 20

15 <210> 47
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 47

20 Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Lys Gly Pro Arg Leu Leu Ile His
 1 5 10 15

25 <210> 48
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 48

ES 2 613 841 T3

Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Arg Asp Tyr Ser
 1 5 10 15

Phe Ser Ile Ser Asn Leu Glu Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5 <210> 49
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 49

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 1 5 10

15 <210> 50
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 50

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Leu Thr
 85 90 95

20 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

25 <210> 51
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 51

ES 2 613 841 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

5 <210> 52
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 52

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

15 <210> 53
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

20 <210> 54
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

30 <210> 55
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Artificial

35 <220>
 <223> Una secuencia de aminoácidos sintetizada artificialmente

<400> 55

ES 2 613 841 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Lys Tyr
 20 25 30

Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asp Tyr Leu Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 56
 <211> 7
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 56

Tyr Thr Ser Thr Leu Gln Pro
 1 5

<210> 57
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 57

His Thr Cys Thr Leu Gln Pro
 1 5

<210> 58
 <211> 363
 <212> ADN
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 58

ES 2 613 841 T3

gaggttcagc tgcagcagtc tggggctgag cttgtgaggc caggggcctt agtcaagttg 60
 tcctgcaaag cttctggcct caacattaa gactactata tgcactgggt gaagcagagg 120
 cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatgataa tactatatat 180
 gacccgaagt tccagggcaa ggccagtata acagcagaca cgtcctccaa cacagcctac 240
 ctgcacctca gcagcctgac atctgaggac actgccgtct attactgtgc tagagcctat 300
 ggttacgacg attactatgc tatggaatac tggggctcaag gaacctcagt caccgctccc 360
 tca 363

5 <210> 59
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 59

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

10 <210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> *Mus musculus*
 <400> 60

ES 2 613 841 T3

Asp Tyr Tyr Met His
1 5

5 <210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 61

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asn Thr Ile Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15

10 Gly

15 <210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 62

Ala Tyr Gly Tyr Asp Asp Tyr Tyr Ala Met Glu Tyr
1 5 10

20 <210> 63
<211> 327
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25 <400> 63

```

aacattatga tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggtcact      60
atgagctgta agtccagtca aagtgtttta tacagttcaa atcagaagaa ctacttggcc      120
tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactggac ttccactagg      180
gaatcaggtg tcccggatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactcttacc      240
atcagcagtg ttcaagctga agacctggca atttattact gtcacataata tctctactcg      300
tacacgttcg gaggggggac caagctg                                           327

```

30 <210> 64
<211> 109
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

35 <400> 64

ES 2 613 841 T3

Asn Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95

Tyr Leu Tyr Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105

<210> 65
 <211> 17
 5 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 65

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

10 Ala

<210> 66
 <211> 7
 15 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 66

Trp Thr Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

20 <210> 67
 <211> 8
 <212> PRT
 25 <213> *Mus musculus*
 <400> 67

His Gln Tyr Leu Tyr Ser Tyr Thr
 1 5

ES 2 613 841 T3

<210> 68
<211> 34
<212> ADN
<213> Artificial
5
<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 68
10 cccaagctta ccatggaatg gagttggata tttc 34

<210> 69
<211> 25
<212> ADN
15 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
20
<400> 69
ccgctcgaga cggtgaccgt ggtcc 25

<210> 70
<211> 34
25 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente
30
<400> 70
cccaagctta ccatgagacc gtctattcag ttcc 34

<210> 71
<211> 31
35 <212> ADN
<213> Artificial

<220>
40 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 71
aatacgtacg ttgatttcc agcttggtcc c 31
45
<210> 72
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial
50
<220>
<223> Una secuencia peptídica sintetizada artificialmente

<400> 72

55 His Thr Ser Thr Leu Gln Pro
1 5

<210> 73
<211> 26
<212> ADN
60 <213> Artificial

<220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 73
 cggaattctg ttggacact gcatcc 26

5 <210> 74
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 74
 acgcgtcgac tggttgcgta aattttgg 28

15 <210> 75
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 75
 acgcgtcgac aggaataaac tgacatcc 28

25 <210> 76
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 76
 acgcgtcgac tgctgtccg aggaggtgg 29

35 <210> 77
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 77
 acgcgtcgac aggtggaggt tgagtaag 28

45 <210> 78
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 78
 acgcgtcgac agtaagtttt ggaggacg 28

55 <210> 79
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

65 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 79
 acgcgctgcac aggacgacct ttaggaat 28

5 <210> 80
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 80
 cgtcctccaa aacttgaag atctctcgag cggccgcatc gtgactgact gacg 54

15 <210> 81
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 81
 cgggatcctt tattcctaaa ggctcgtctc caaaacttg aagatctctc gag 53

25 <210> 82
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 82
 actcaacctc cacctgaag atctctcgag cggccgcatc gtgactgact gacg 54

35 <210> 83
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 83
 cgggatcccg tcctcaaaa ctactcaac ctccacctg aagatctctc gag 53

45 <210> 84
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 84
 cctcggaaca gcaattgaag atctctcgag cggccgcatc gtgactgact gacg 54

55 <210> 85
 <211> 53
 <212> ADN
 <213> Artificial

60 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

65 <220>
 <223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

ES 2 613 841 T3

<400> 85
cgggatccac tcaacctcca cctcctcgga acagcaattg aagatctctc gag 53

5 <210> 86
<211> 54
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 86
gacctcaaaa acactgaag atctctcgag cggccgcatc gtgactgact gacg 54

15 <210> 87
<211> 53
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

<400> 87
cgggatcccc tcggaacagc aatgacctca aaaacacttg aagatctctc gag 53

25 <210> 88
<211> 30
<212> ADN
<213> Artificial

30 <220>
<223> Una secuencia de cebador sintetizada artificialmente

35 <400> 88
aactgcaggc atcgtggtgt cacgctcgtc 30

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que reconoce el dominio extracelular de CLCP1 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 461 a 470 en la SEQ ID NO: 2 pero que no reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 466 a 475 en la SEQ ID NO: 2.
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, que reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 465 en la SEQ ID NO: 2 pero que no reconoce un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 451 a 460 en la SEQ ID NO: 2.
4. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una actividad de inhibición de la migración de una célula cancerosa que expresa CLCP1.
5. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una actividad de inhibición de la invasión de una célula cancerosa que expresa CLCP1.
6. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una actividad de inhibición del crecimiento de una célula cancerosa que expresa CLCP1.
7. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene una actividad de inhibición de la metástasis de una célula cancerosa que expresa CLCP1.
8. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa que expresa CLCP1.
9. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde la célula cancerosa que expresa CLCP1 es una célula de cáncer de riñón, una célula de tumor de vejiga urinaria, una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de páncreas, una célula de cáncer de estómago, una célula de cáncer de intestino grueso, una célula de cáncer de mama o una célula de cáncer de pulmón.
10. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que las secuencias de aminoácidos de cada una de las regiones determinantes de la complementariedad de región variable de cadena pesada (VH CDR1, VH CDR2 y VH CDR3) y cada una de las regiones determinantes de la complementariedad de región variable de cadena ligera (VL CDR1, VL CDR2 y VL CDR3) se seleccionan de (A) a (C):
- (A)
- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 57 o 72, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (B)
- (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 60 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 61 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 62 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(C)

- 5 (1) VH CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VH CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- 10 (3) VH CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (4) VL CDR1: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- 15 (5) VL CDR2: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 56 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (6) VL CDR3: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma.

20 11. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que las secuencias de aminoácidos de la región variable de cadena pesada (VH) y de la región variable de cadena ligera (VL) se seleccionan de (A) a (C):

(A)

- 25 (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 o 15, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 55 o 20, o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

30 (B)

- (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 59 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- 35 (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 64 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;

(C)

- 40 (1) VH: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma;
- (2) VL: la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 o una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma.

45 12. Un anticuerpo aislado que reconoce el dominio extracelular de CLCP1 humano que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

50 13. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es un Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv, dsFv, díacuerpo o sc(Fv)₂.

14. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es un anticuerpo de IgG.

15. El anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que es un anticuerpo humanizado.

55 16. Un ácido nucleico aislado que codifica el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

17. Un vector que porta el ácido nucleico de la reivindicación 16 de una manera expresable.

60 18. Una célula transformada que comprende el vector de la reivindicación 17.

19. Un método para producir un anticuerpo, que comprende las etapas de:

- (a) cultivar la célula transformada de la reivindicación 18; y
- (b) aislar y purificar el anticuerpo como un producto de expresión.

65 20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1

a 15 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

21. Un agente seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 5 (i) un agente para inhibir la migración de células cancerosas, que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 4;
- (ii) un agente para inhibir la invasión de células cancerosas, que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 5;
- 10 (iii) un agente para inhibir la metástasis de células cancerosas, que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 7;
- (iv) un agente para inhibir el crecimiento de células cancerosas, que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 6; y
- (v) un agente citotóxico contra células cancerosas, que comprende el anticuerpo aislado de la reivindicación 8.

15 22. Un agente farmacéutico seleccionado entre el grupo que consiste en:

- (i) un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento o la prevención de un tumor, que comprende el anticuerpo aislado de las reivindicaciones 6 u 8;
- 20 (ii) un agente farmacéutico para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer, que comprende el anticuerpo aislado de las reivindicaciones 6 u 8; y
- (iii) un agente farmacéutico para su uso en la detección inmunológica de la expresión de CLCP1 en una célula o un tejido, que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

25 23. El agente farmacéutico de la reivindicación 22 (ii) para su uso en el tratamiento o la prevención de cáncer que expresa CLCP1, que tiene al menos un efecto inhibitor seleccionado entre inhibición de la migración, inhibición de la invasión, inhibición de la metástasis e inhibición del crecimiento.

30 24. Un kit para su uso en la detección inmunológica de la expresión de CLCP1 en una célula o un tejido, que comprende el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y sustratos necesarios para detección de etiquetas.

35 25. Un agente de diagnóstico o un kit para pronóstico de cáncer, que comprenden el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en donde el kit comprende adicionalmente sustratos necesarios para detección de etiquetas.

26. Un método inmunológico que comprende las etapas de:

- 40 (a) poner en contacto una célula o un tejido aislados con el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15; y
- (b) detectar la expresión de CLCP1 en la célula o el tejido.

45 27. Un método para diagnosticar cáncer o para un pronóstico de cáncer, que comprende las etapas de poner en contacto un tejido patológico aislado con el anticuerpo aislado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 y detectar de forma inmunológica la expresión de CLCP1 en una célula del tejido patológico.

28. Un método de cribado de una sustancia candidata que inhibe el crecimiento, la invasión, la migración o la metástasis de células cancerosas, o una sustancia candidata que tiene citotoxicidad frente a una célula cancerosa, que comprende las etapas de:

- 50 (i) poner en contacto una sustancia de ensayo con un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de las posiciones 456 a 470 en la SEQ ID NO: 2;
- (ii) detectar la unión entre una sustancia de ensayo y el péptido; y
- (iii) seleccionar una sustancia de ensayo que se una al péptido.

55 29. El anticuerpo seleccionado entre el grupo que consiste en:

- 60 (i) el anticuerpo aislado de la reivindicación 4 para su uso en un método para inhibir la migración de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- (ii) el anticuerpo aislado de la reivindicación 5 para su uso en un método para inhibir la invasión de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- (iii) el anticuerpo aislado de la reivindicación 7 para su uso en un método para inhibir la metástasis de la célula cancerosa que expresa CLCP1
- (iv) el anticuerpo aislado de la reivindicación 6 para su uso en un método para inhibir el crecimiento de la célula cancerosa que expresa CLCP1;
- 65 (v) el anticuerpo aislado de la reivindicación 8 para su uso en un método para dañar la célula cancerosa que expresa CLCP1;

(vi) el anticuerpo aislado de la reivindicación 6 para su uso en un método para tratar o prevenir un tumor que expresa CLCP1; y

(vii) el anticuerpo aislado de la reivindicación 6 para su uso en un método para tratar o prevenir un cáncer que expresa CLCP1.

5



MASRAVVRAR	RCPOCPQVRA	AAAAPAWAAL	PLSRSLPPCS	40
NSSSFSMPLF	LLLLLVLLLL	LEDAGAQQGD	<u>GCGHTVLGPE</u>	80
<u>SGTLTSINYP</u>	<u>QTYPNSTVCE</u>	<u>WEIRVKMGER</u>	<u>VRIKFGDFDI</u>	120
<u>EDSDSCHFNY</u>	<u>LRIYNGIGVS</u>	<u>RTEIGKYCGL</u>	<u>GLOMNHSIES</u>	160
<u>KGNEITLLFM</u>	<u>SGIHVSGRGF</u>	<u>LASYVIDKQ</u>	<u>DLITCLDTAS</u>	200
<u>NFLEPEFSKY</u>	<u>CPAGCLLPFA</u>	<u>EISGTIPHG</u>	<u>RDSSPLCMAG</u>	240
<u>VHAGVVSNTL</u>	<u>GGQISVVISK</u>	<u>GIPYYESSLA</u>	<u>NNVTSVVGHL</u>	280
STSLFTFKTS	GCYGLGMES	GVIADPQITA	SSVLEWTDHT	320
GQENSWKPKK	ARLKKPGPPW	AAFATDEYQW	LQIDLNKEKK	360
ITGIITTGST	MVEHNYVSA	YRILYSDDGQ	KWTVYREPGV	400
EQDKIFQGNK	DYHQDVRNMF	LPPIIARFIR	VNPTQWQQKI	440
AMKMELLCQ	FIPKGRPPKL	TQPPPRNSN	DLKNTTAPPK	480
IAKGRAPKFT	QPLQPRSSNE	FPAQTEQTTA	SPDIRNTTVT	520
PNVTKDVALA	<u>AVLVPVLVMV</u>	<u>LTTILILILVC</u>	AWHWRNRKKK	560
TEGTYDLPYW	DRAGWVKGMK	QFLPAKAVDH	EETPVRYSSS	600
EVNHLSPREV	TTVLQADSAE	YAQPLVGGIV	GTLHQIRSTFK	640
PEEGKEAGYA	DLDPYNSPGQ	EVYHAYAEPL	PITGPEYATP	680
IIMDMSGHPT	TSVGQPSTST	FKATGNQPPP	LVGTYNTLLS	720
RTDSCSSAQA	QYDTPKAGKP	GLPAPDELVY	QVPOSTQEVV	760
GAGRDGECDV FKEIL (SEQ ID NO:2)				

SUBRAYADO	SECUENCIA SEÑAL
DOBLE SUBRAYADO	DOMINIO DE CUB
LÍNEA ONDULADA	DOMINIO DE LCCL
PARENTESIS	DOMINIO DE FA58C
LÍNEA PUNTEADA	REGIÓN TRANSMEMBRANA

FIG. 1

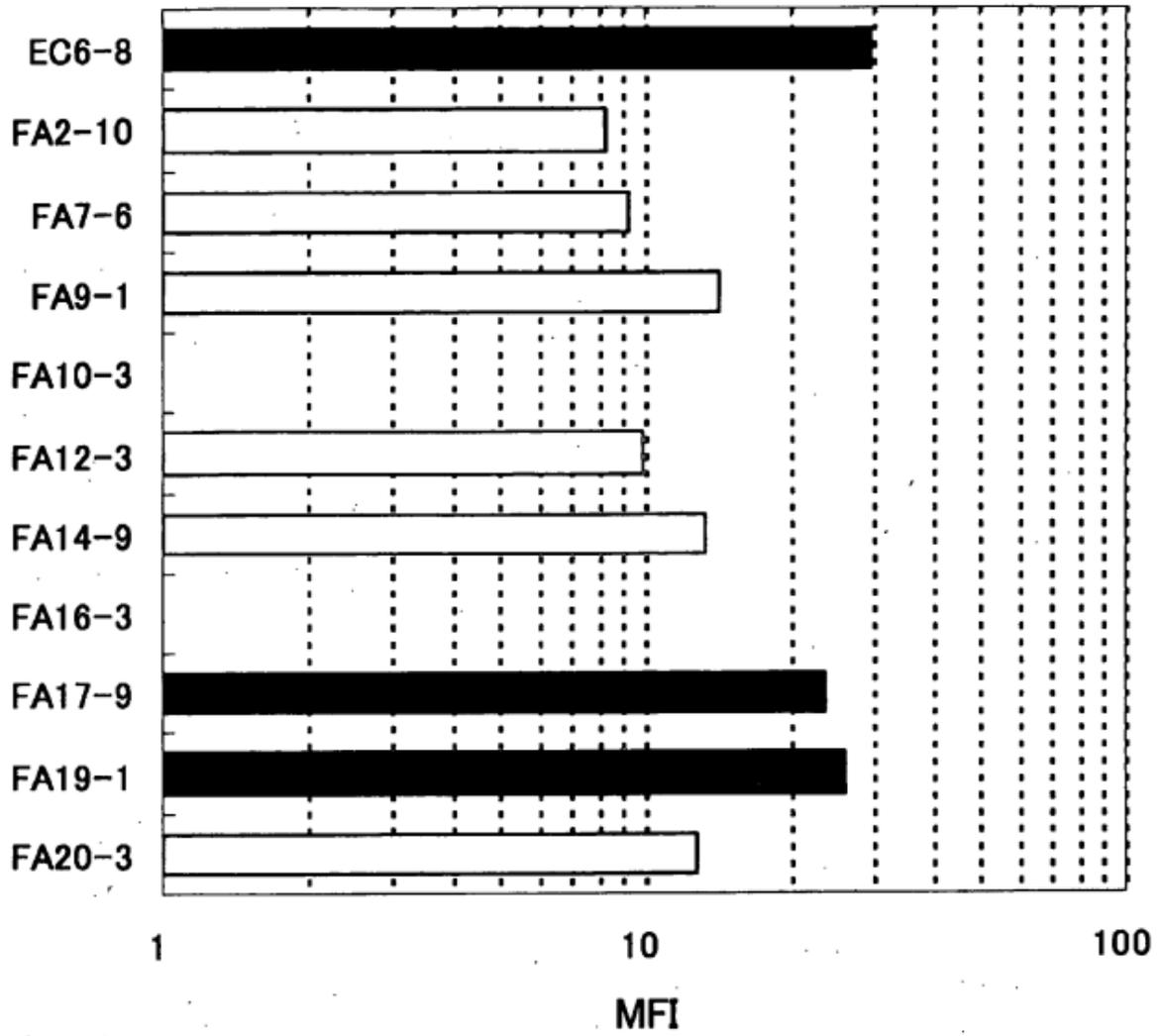


FIG. 2

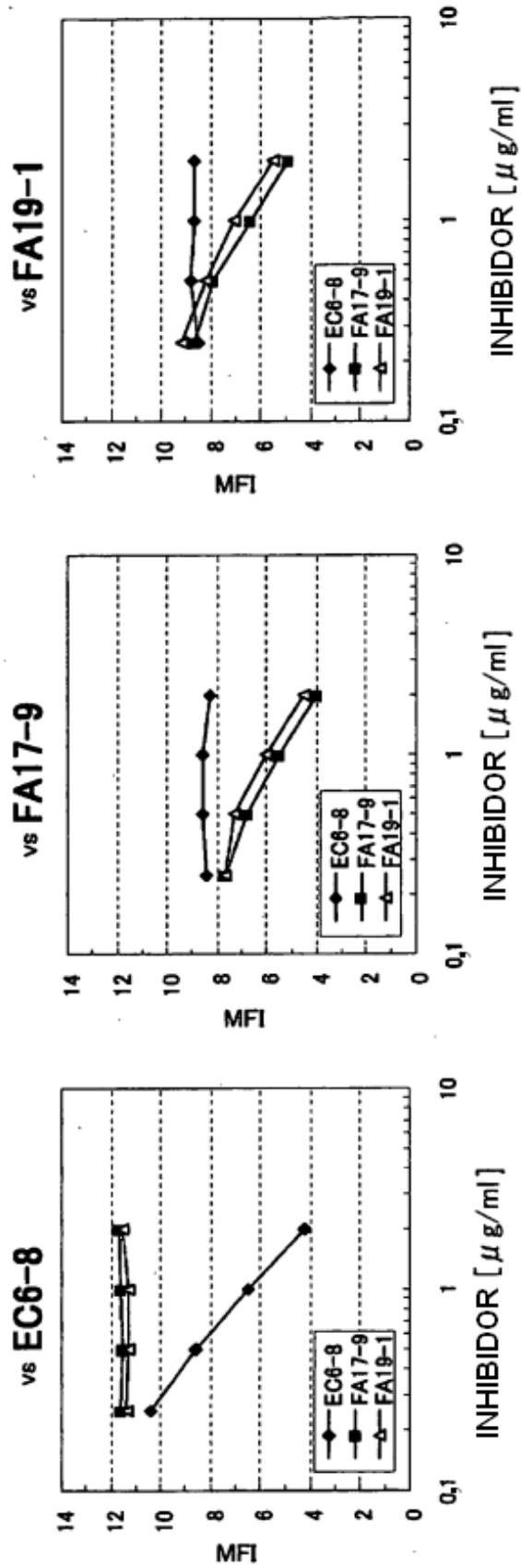


FIG. 3

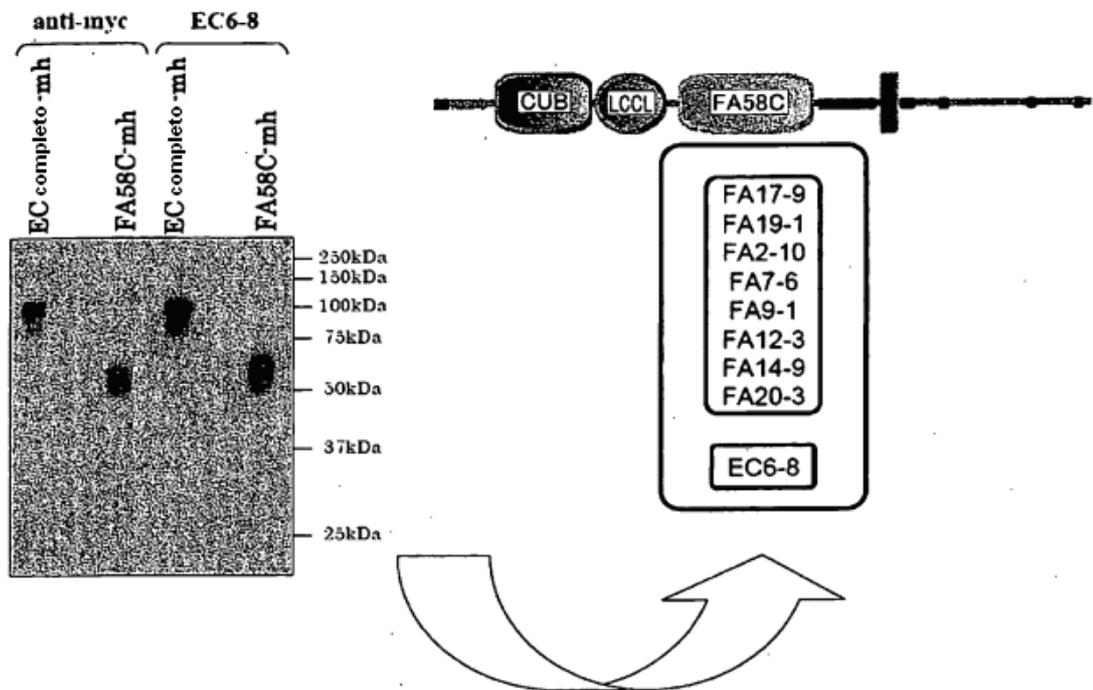


FIG. 4

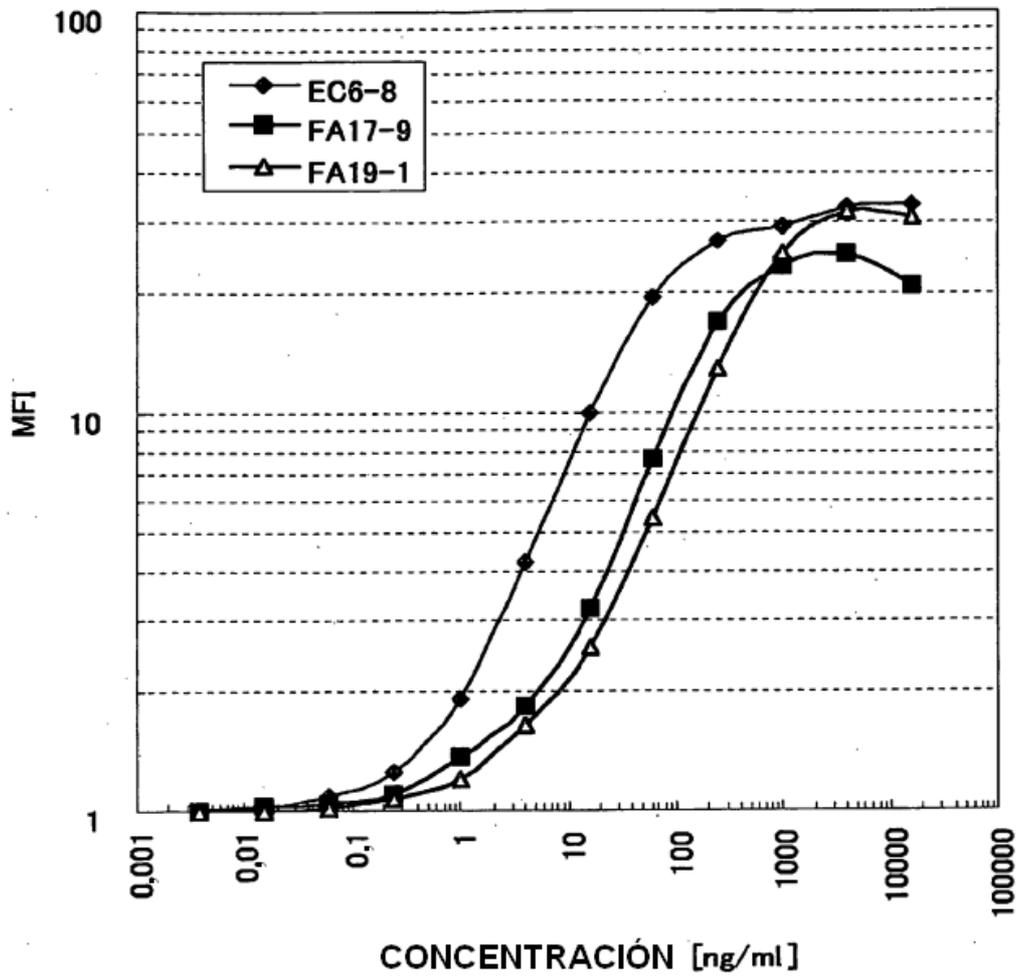


FIG. 5

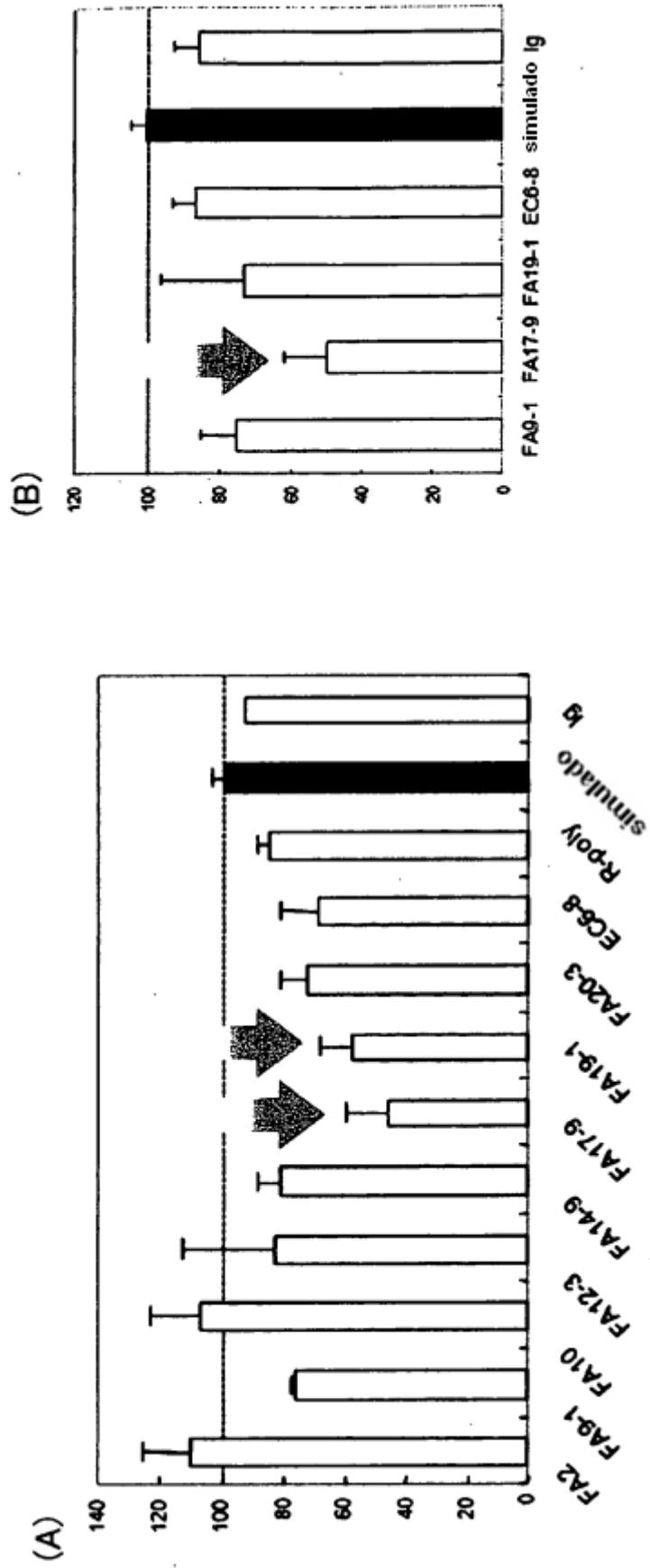


FIG. 6

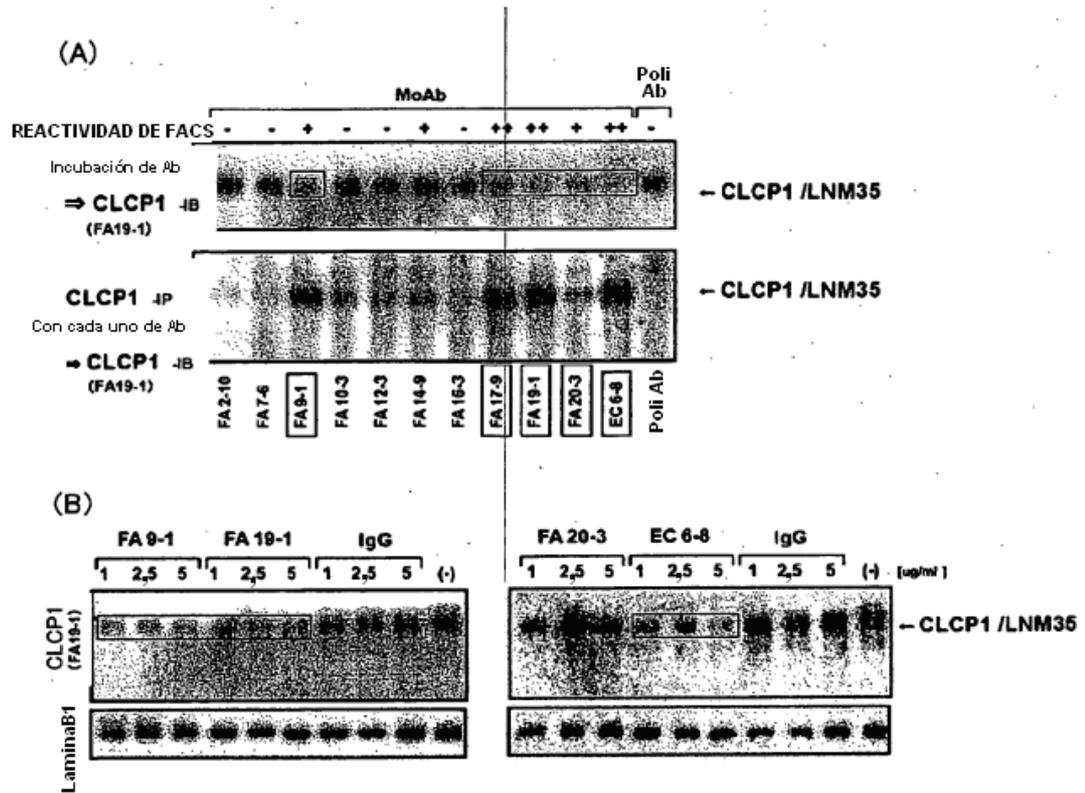
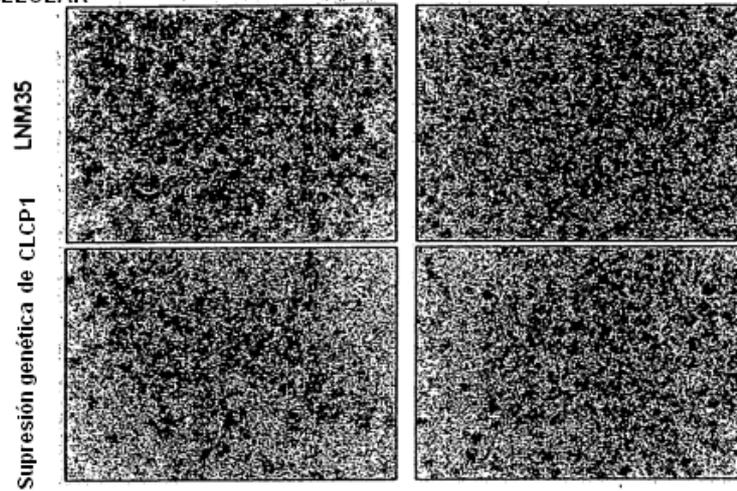
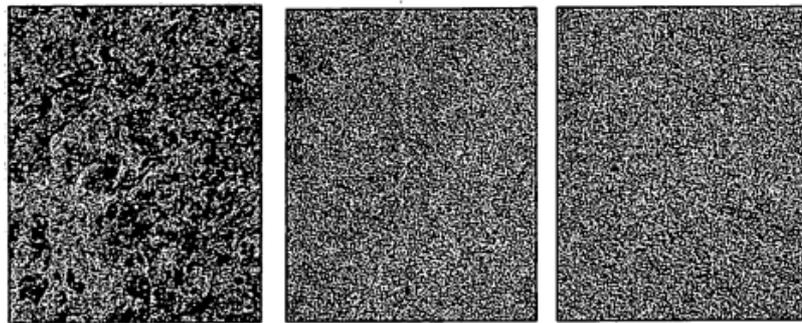


FIG. 7

(A) LÍNEA CELULAR



(B) MUESTRA DE ENSAYO 1 DE PACIENTE CON CÁNCER DE PULMÓN



(C) MUESTRA DE ENSAYO 2 DE PACIENTE CON CÁNCER DE PULMÓN

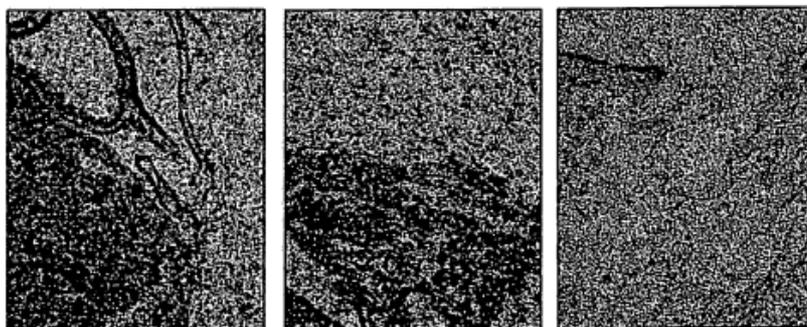


FIG. 8

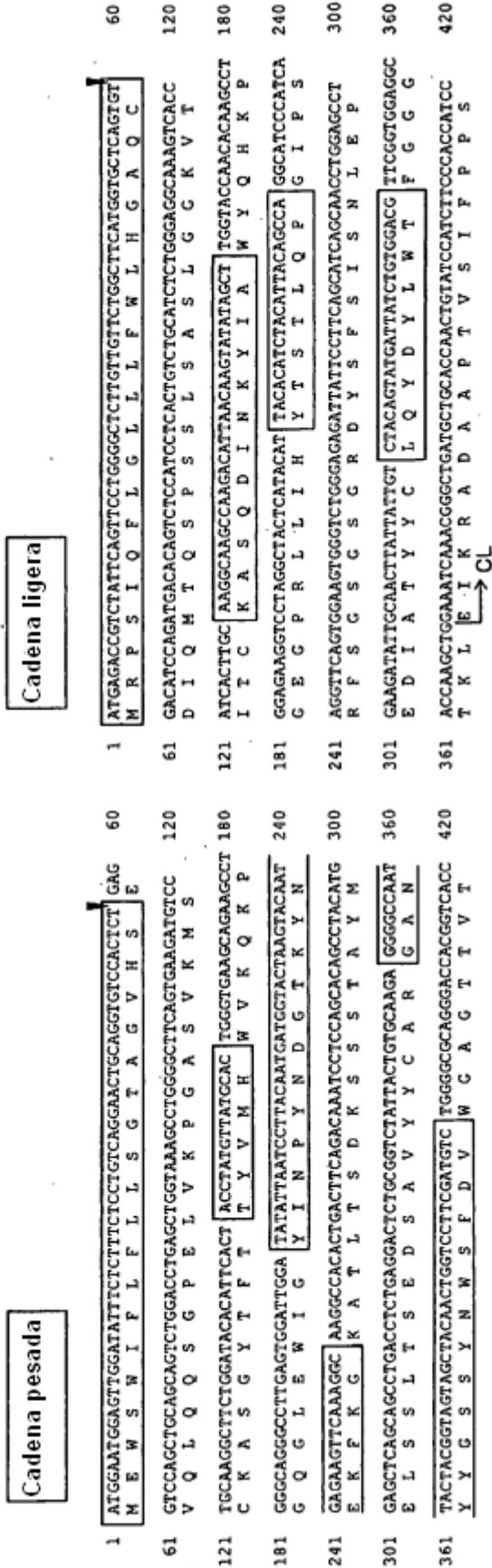


FIG. 9

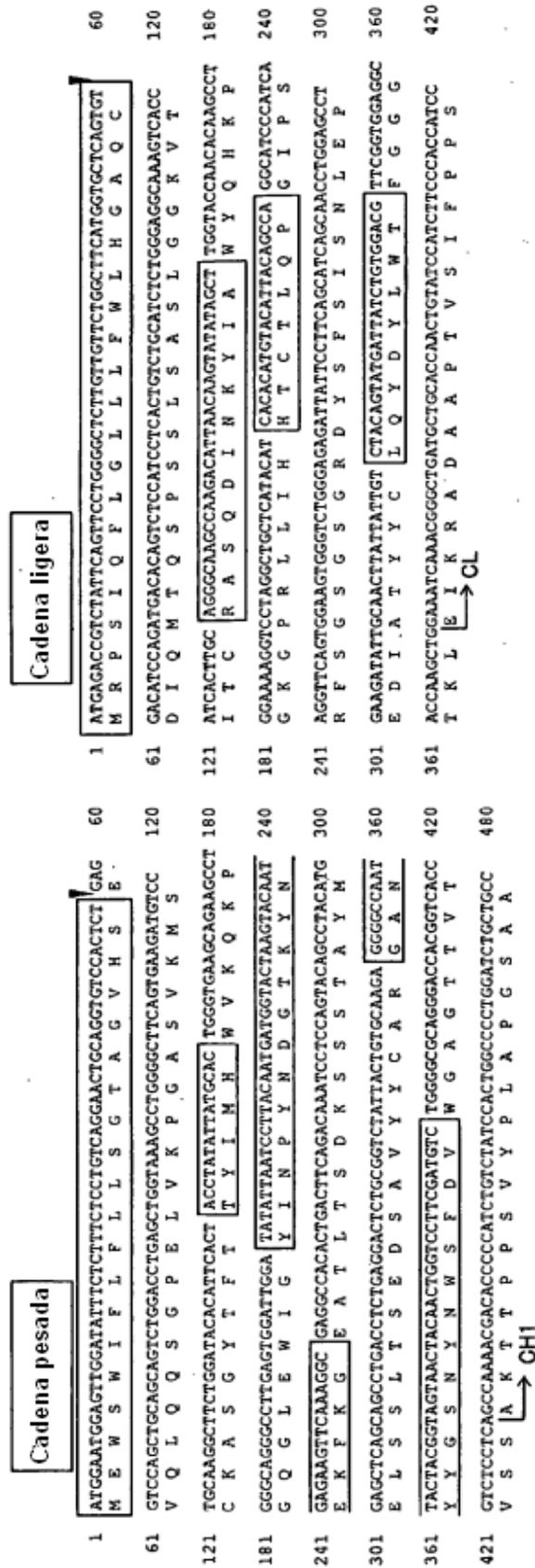


FIG. 10

	CDR1		CDR2		CDR3
FA17-9_VH	EVQLQQSGPELVKPGASVQMSCKASGYTFTTYVMH	WVKQRPGQGLEWIG	YINPYNDGTRKYNEKFKG	KATLTS	SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR
FA19-1_VH	EVQLQQSGPELVKPGASVQMSCKASGYTFTTYIMH	WVKQRPGQGLEWIG	YINPYNDGTRKYNEKFKG	EATLTS	SDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR
					GANYYGSSYNWNSFDV
					WGAGITVVTVSS
					WGAGITVVTVSS
	CDR1		CDR2		CDR3
FA17-9_VL	DIQNTQSPSSLSASLGKVTITCRASQDINKYIA	WYQHKPGGPRLLIH	YTSITLQPGI	SRFSGGSGRDYSP	FSINLEPEDIATYYC
FA19-1_VL	DIQNTQSPSSLSASLGKVTITCRASQDINKYIA	WYQHKPGGPRLLIH	HICTLQPGI	SRFSGGSGRDYSP	FSINLEPEDIATYYC
					LQYDYLWTFGGGTRL
					LQYDYLWTFGGGTRL

FIG. 11

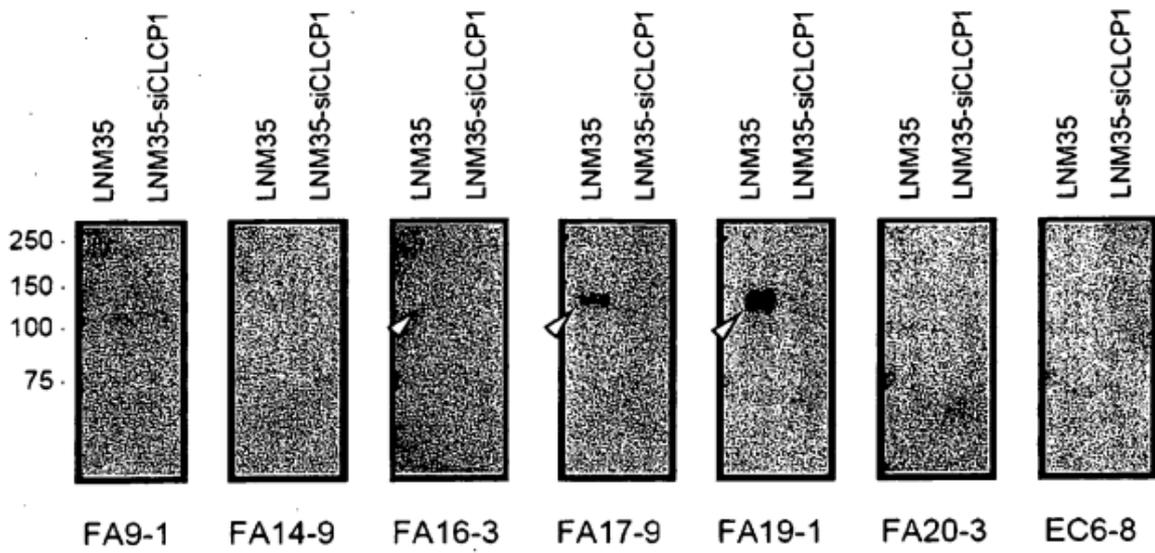


FIG. 12

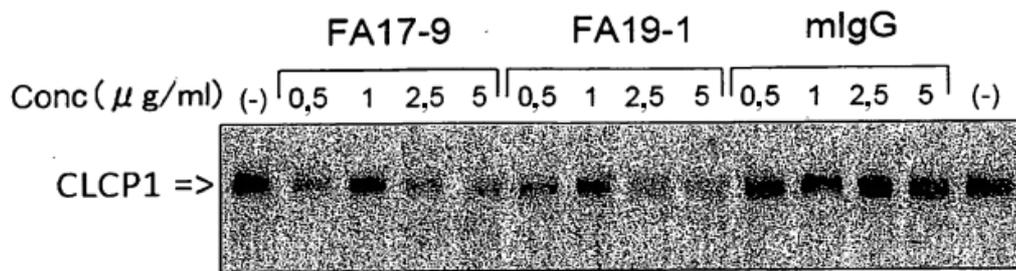


FIG. 13

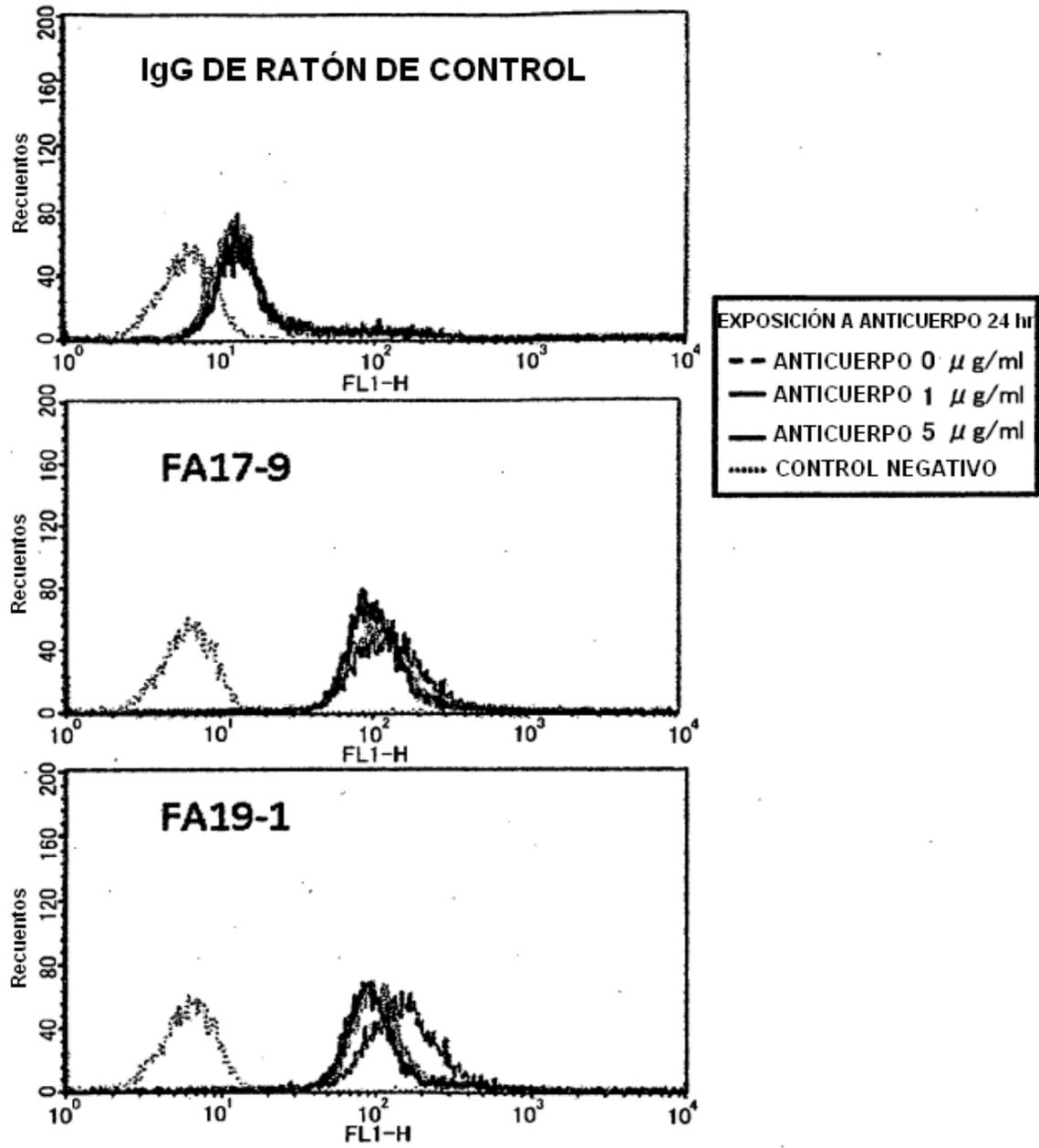


FIG. 14

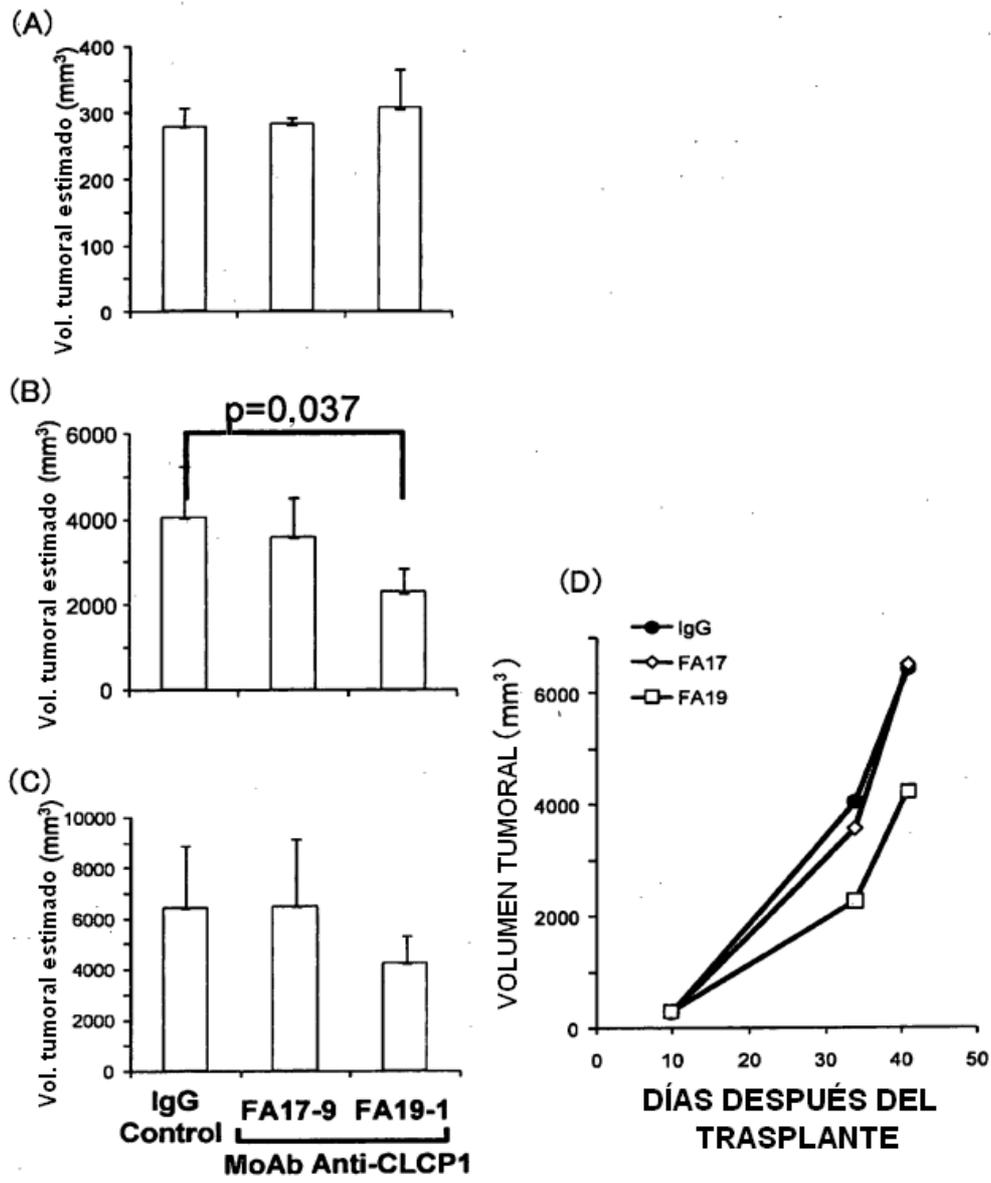


FIG. 15

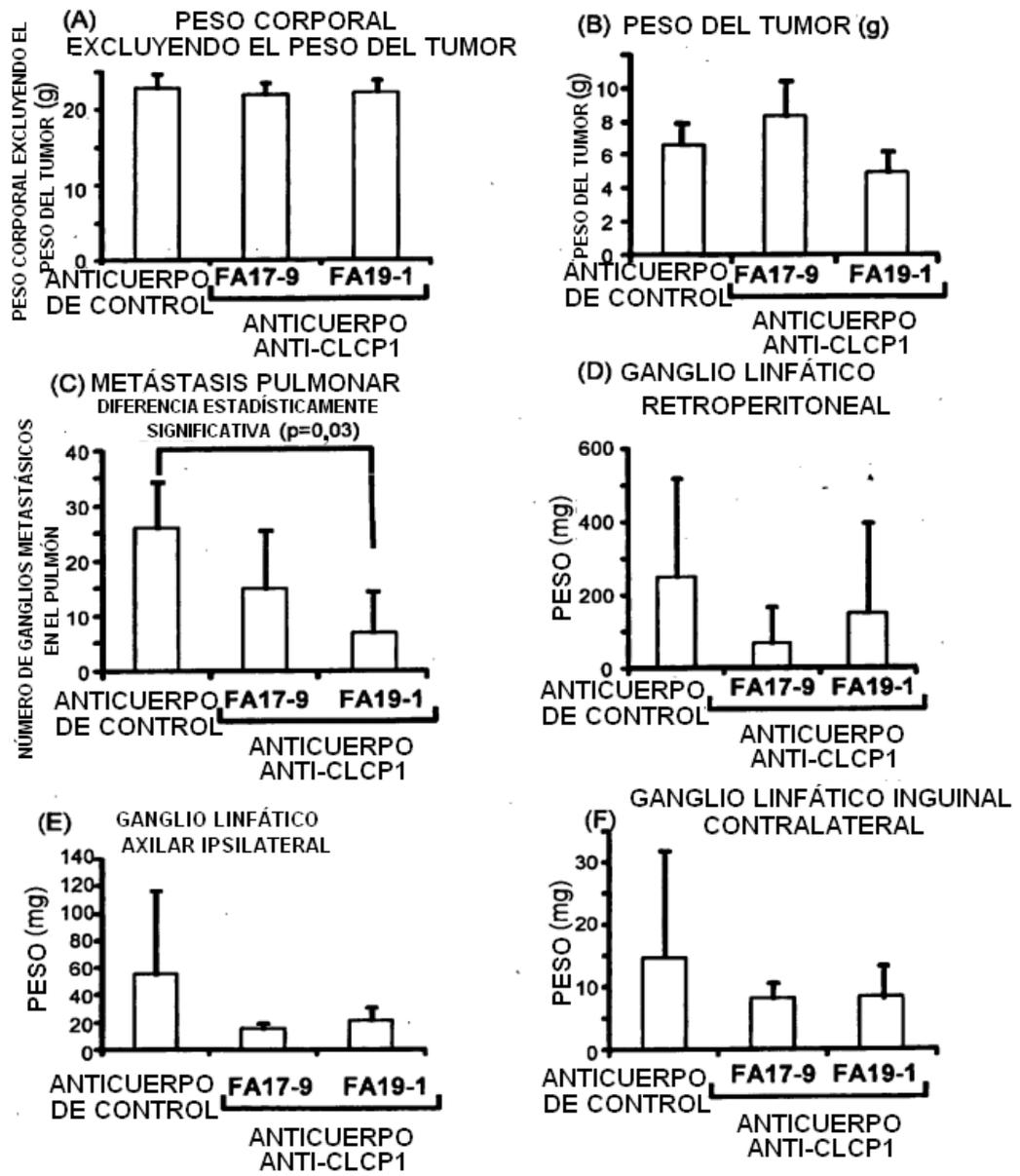


FIG. 16

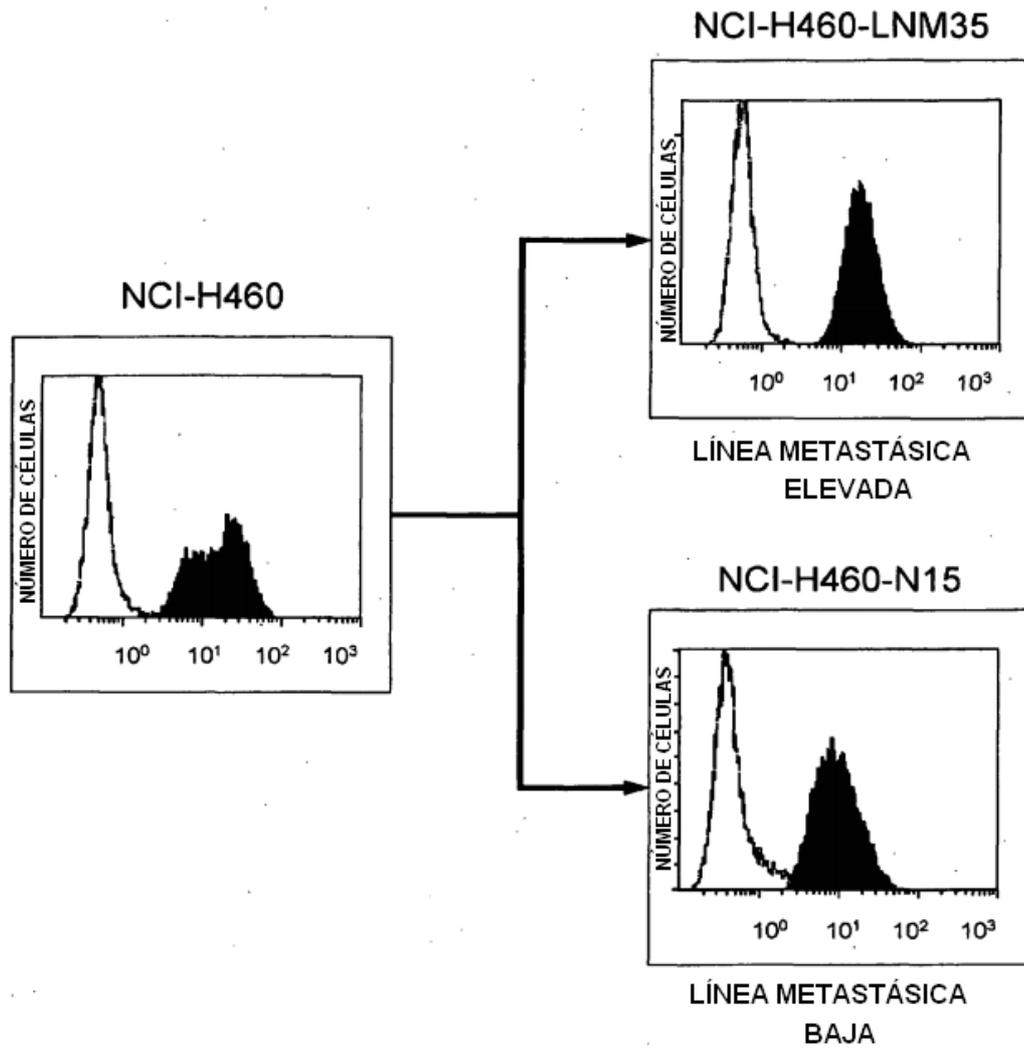


FIG. 17

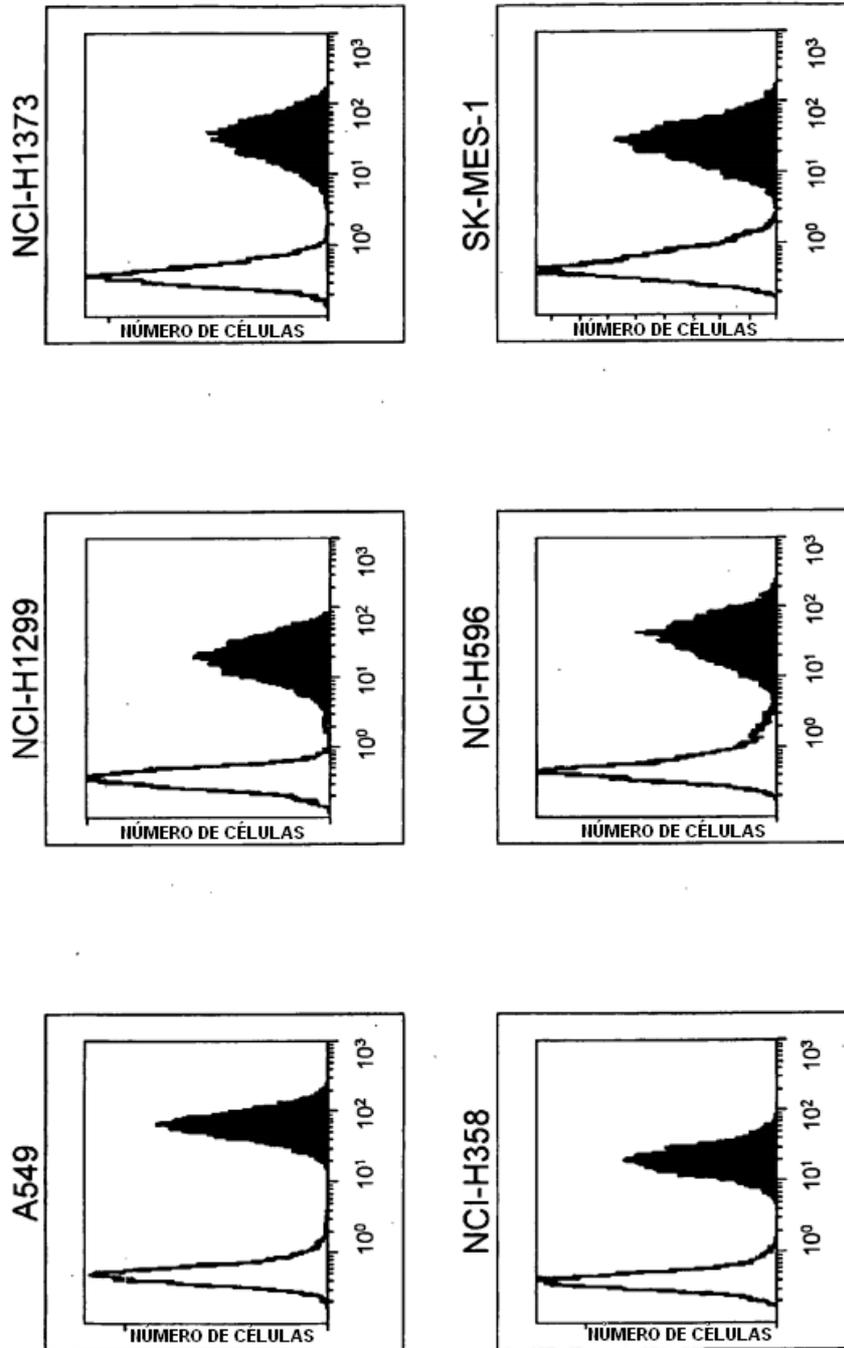


FIG. 18

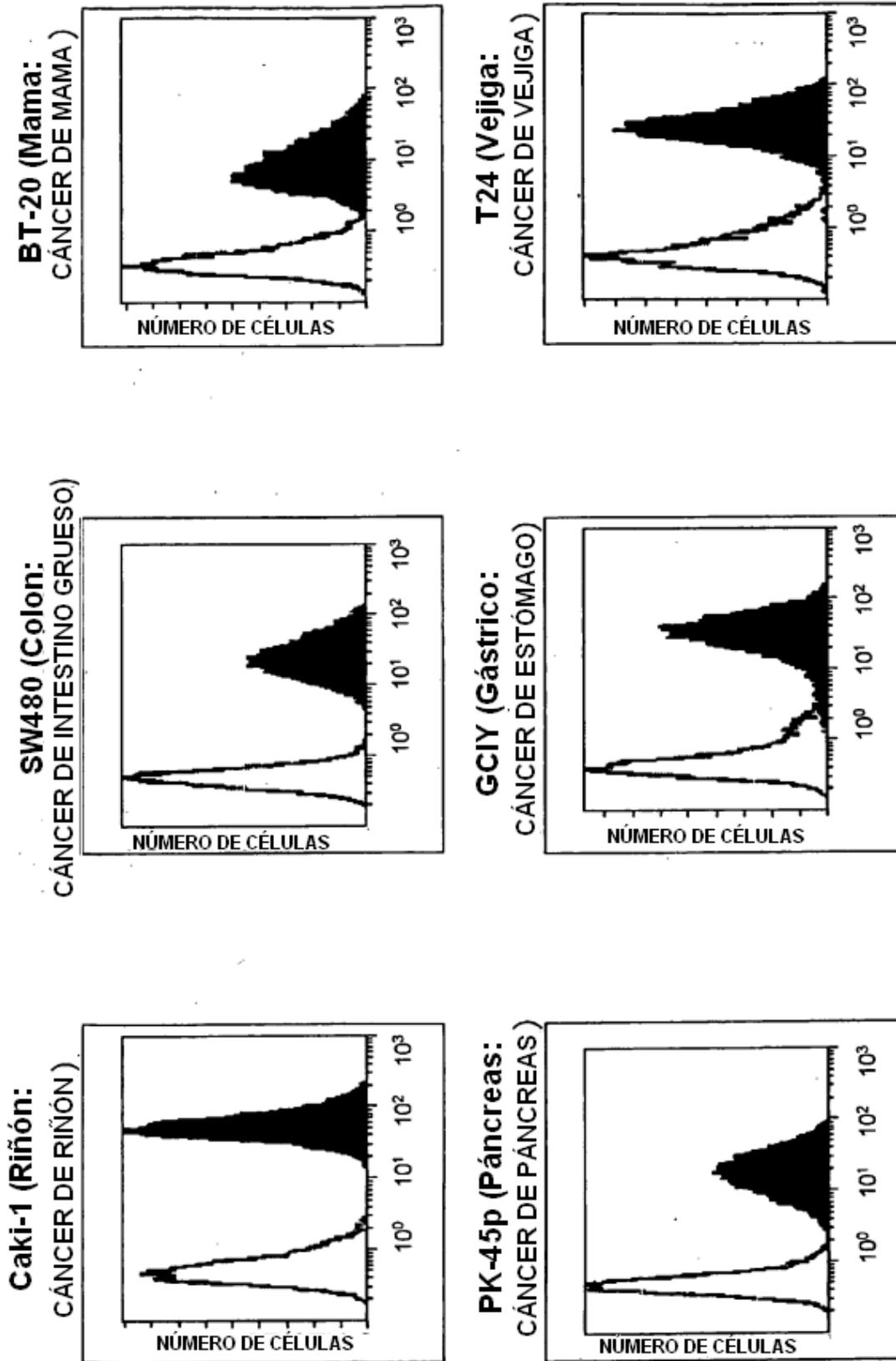


FIG. 19

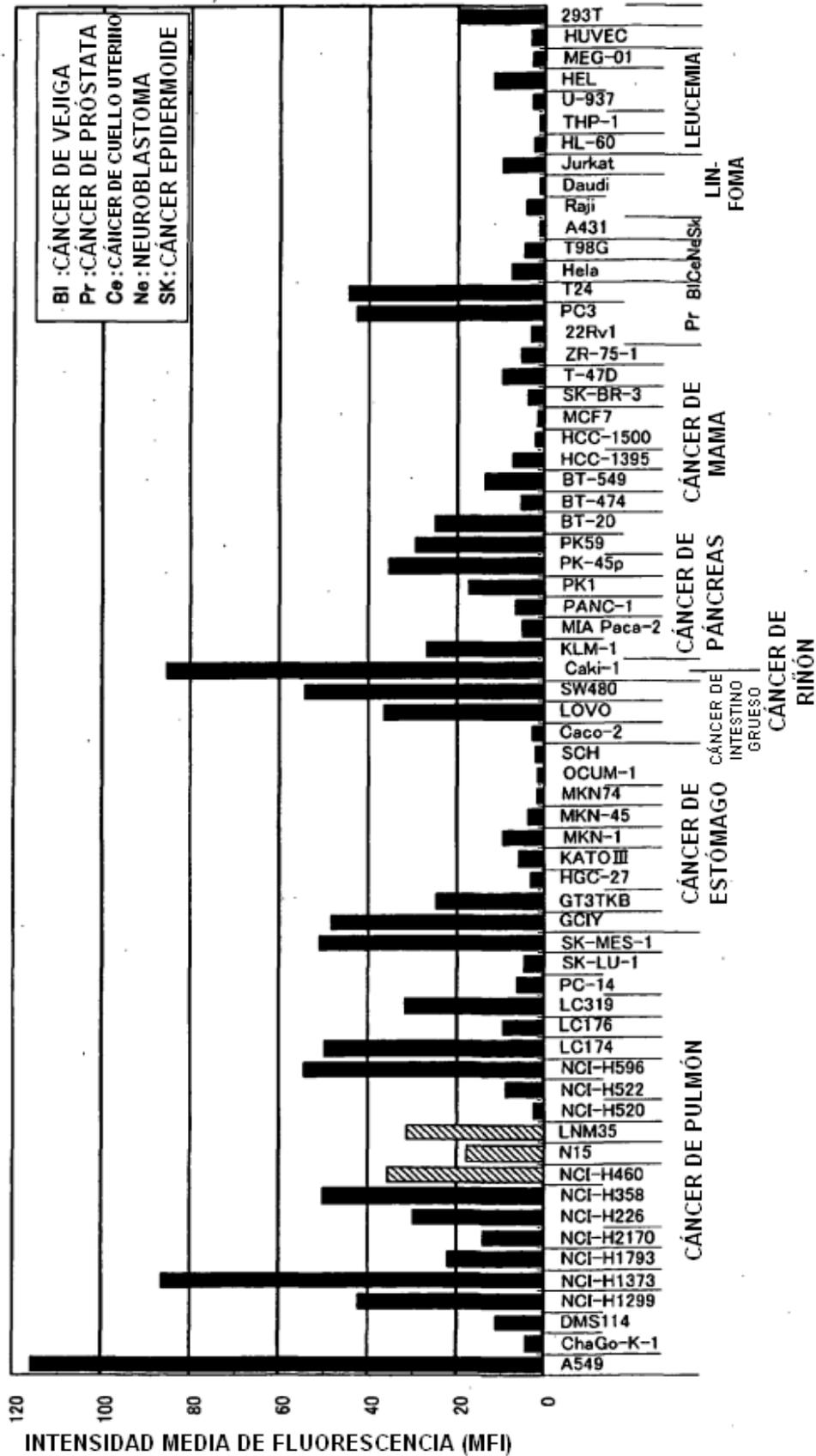


FIG. 20

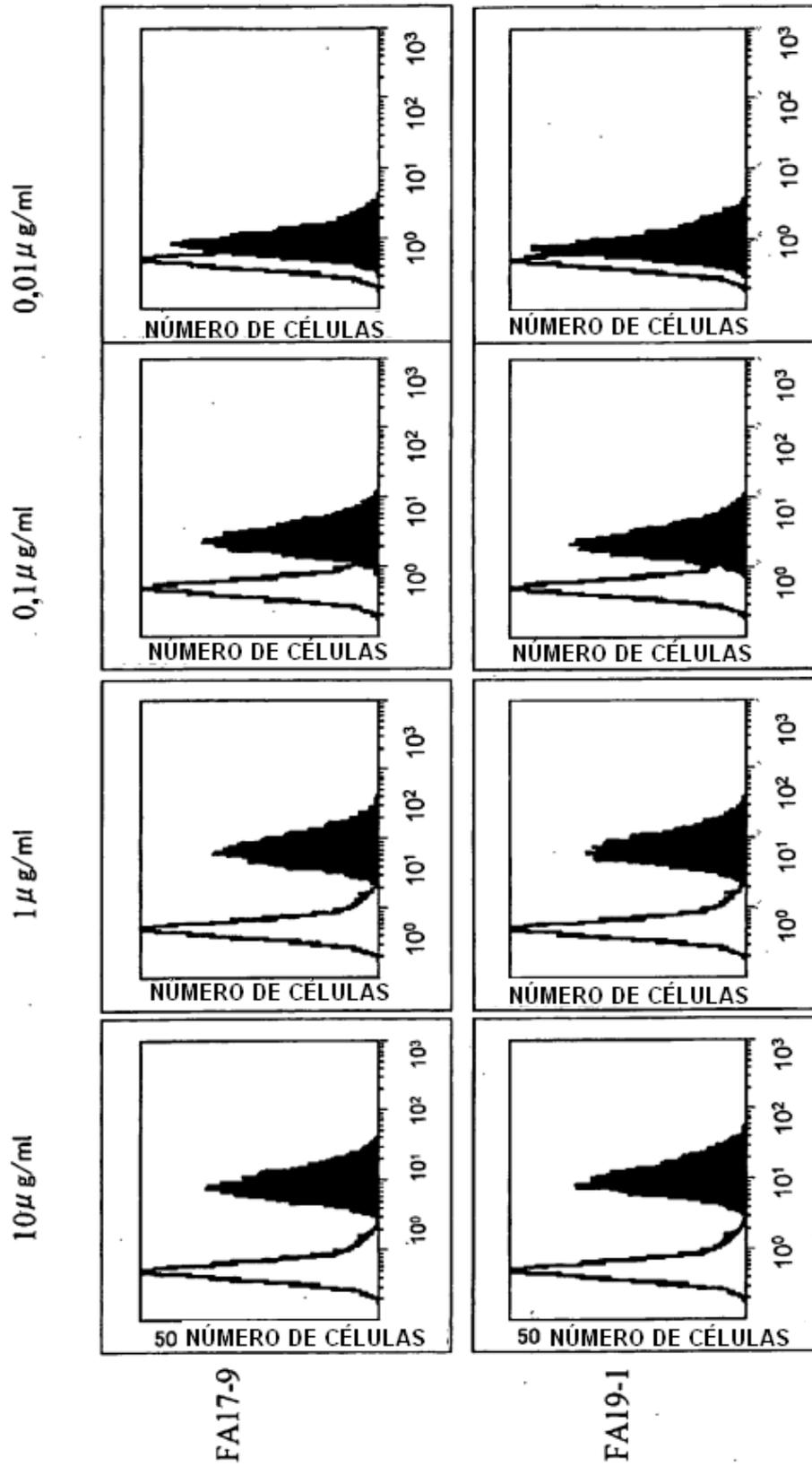
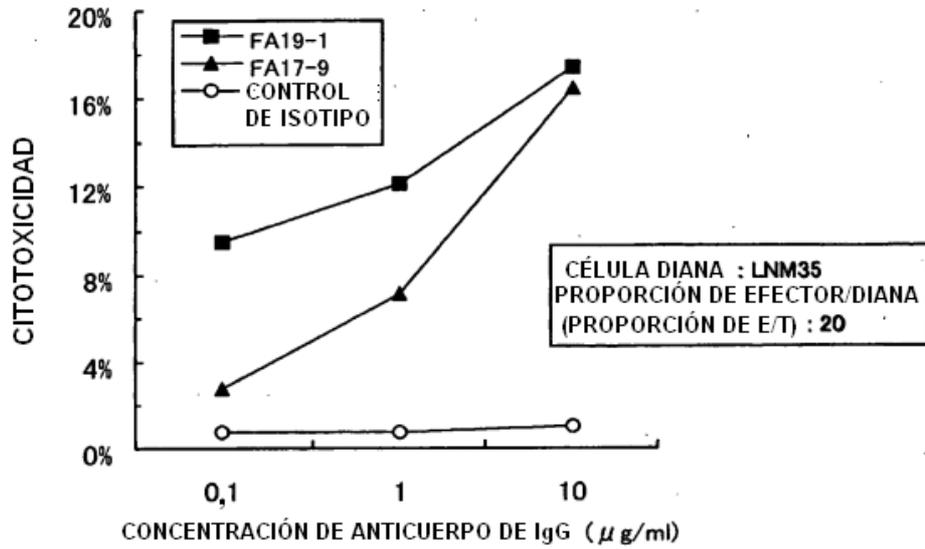


FIG. 21

(A)



(B)

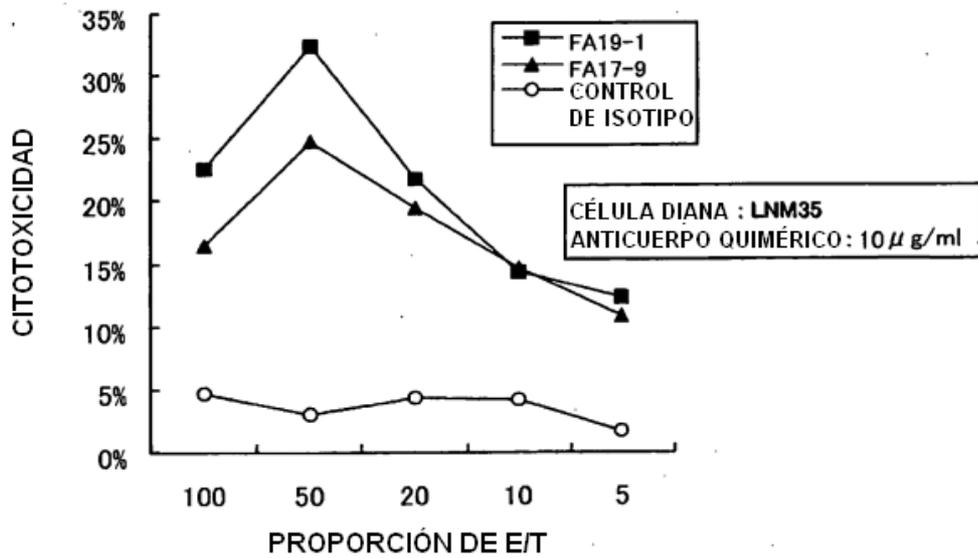


FIG. 22

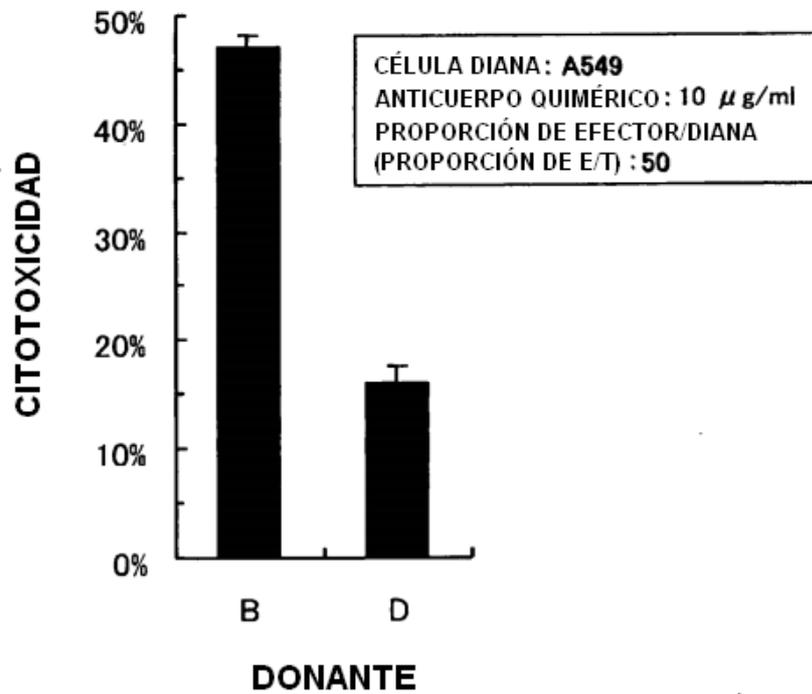
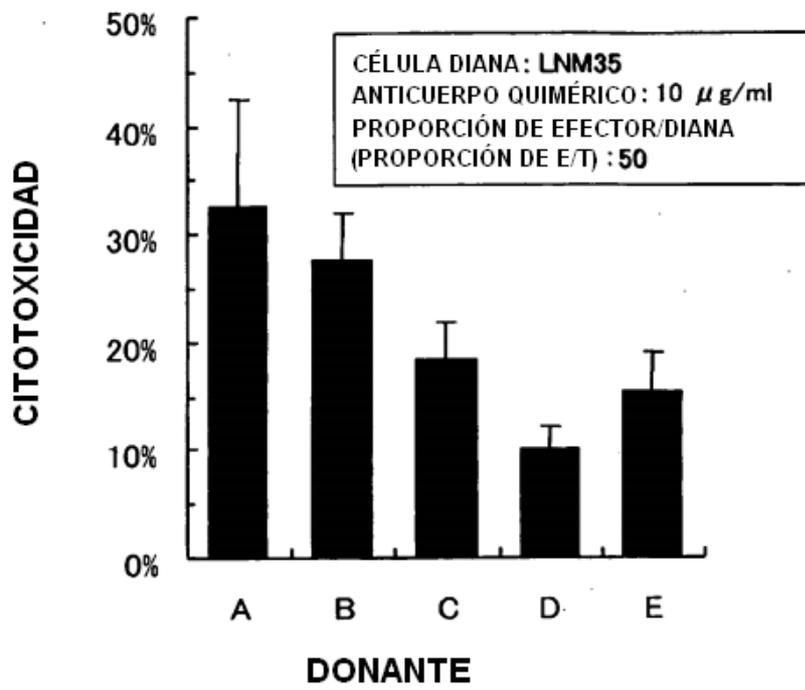


FIG. 23

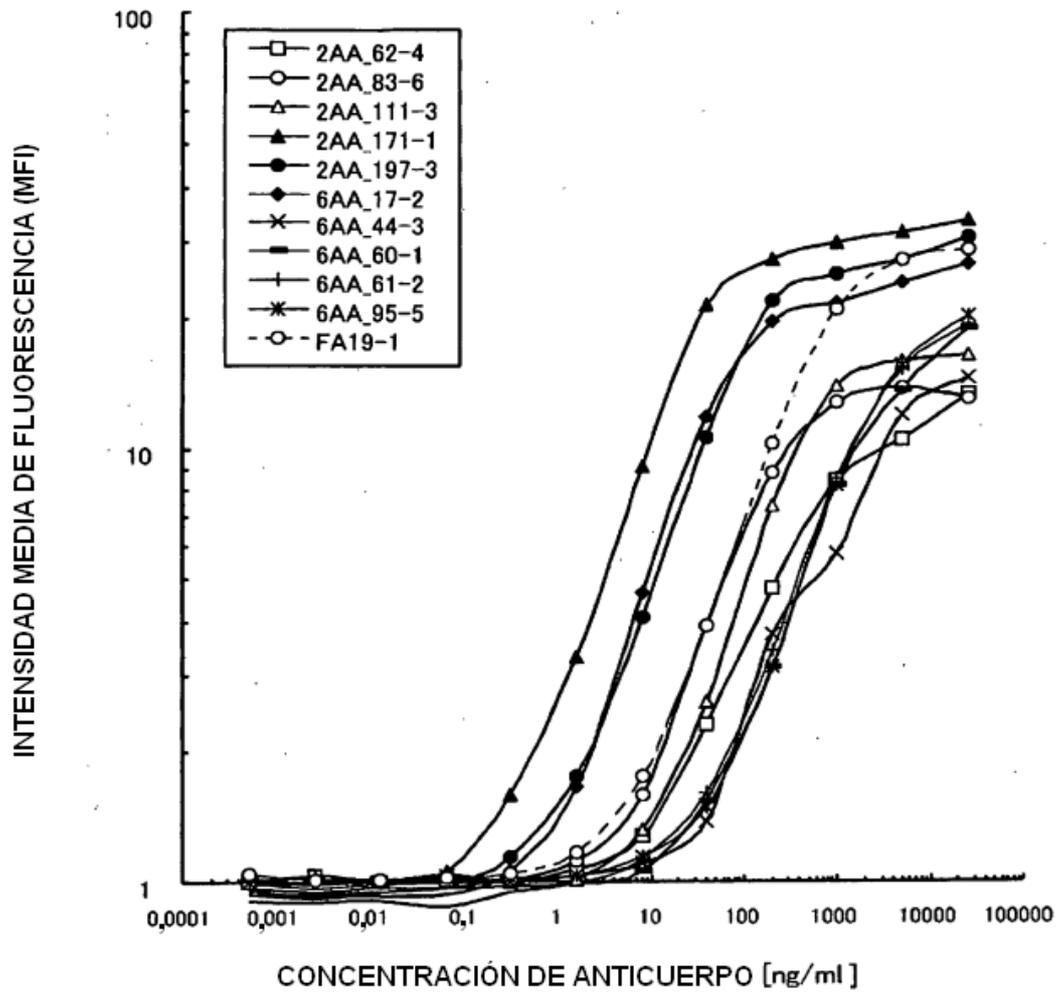


FIG. 24

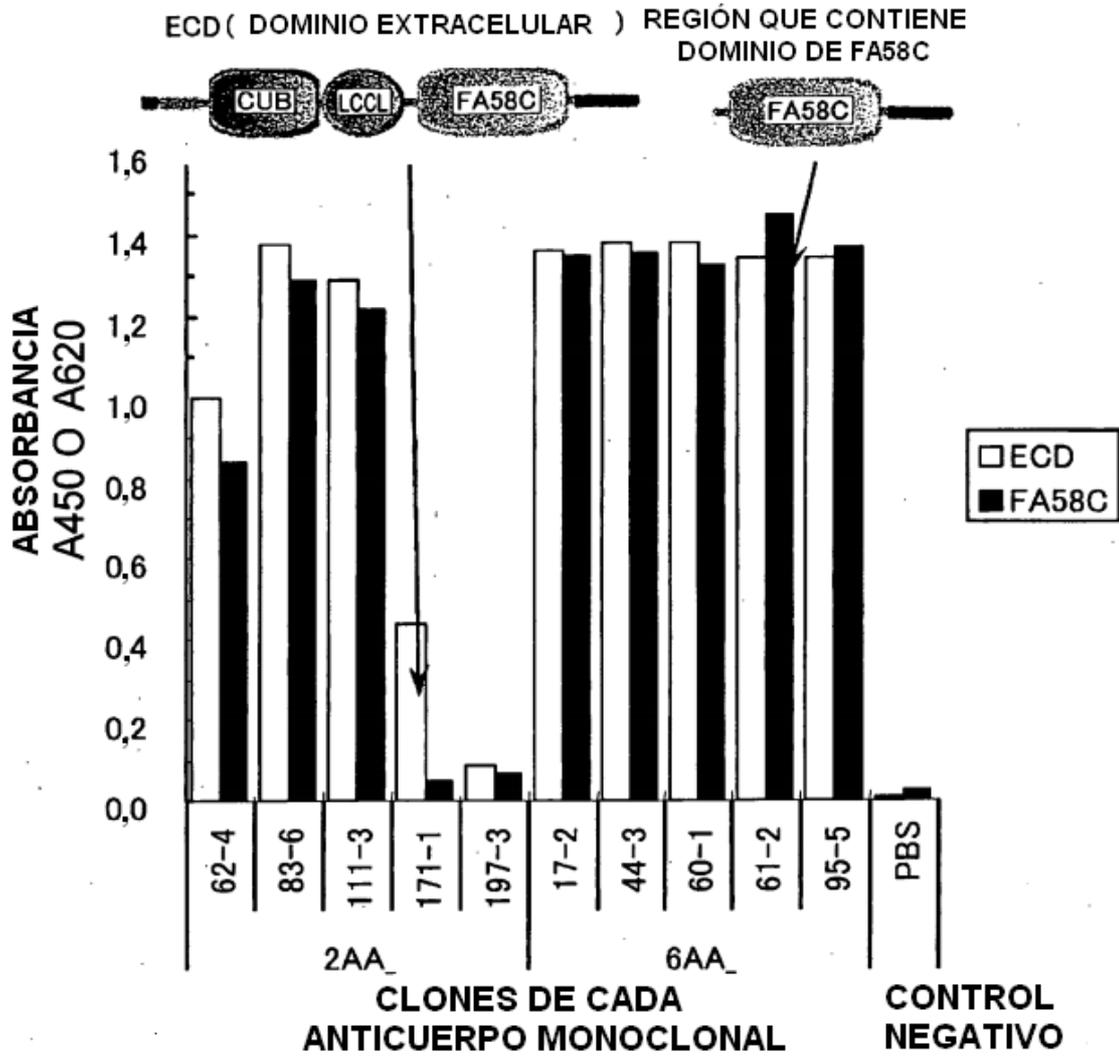


FIG. 25

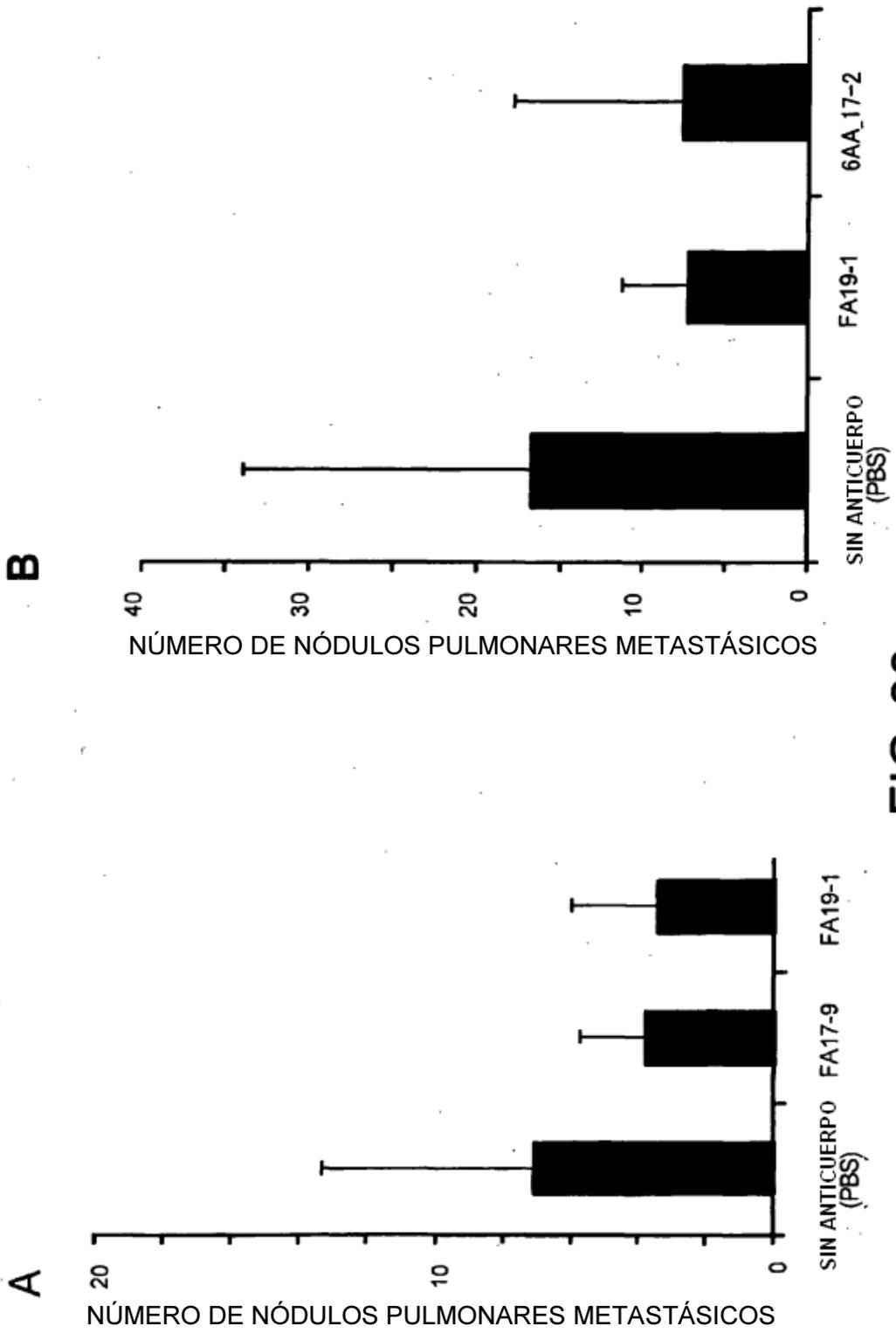


FIG. 26

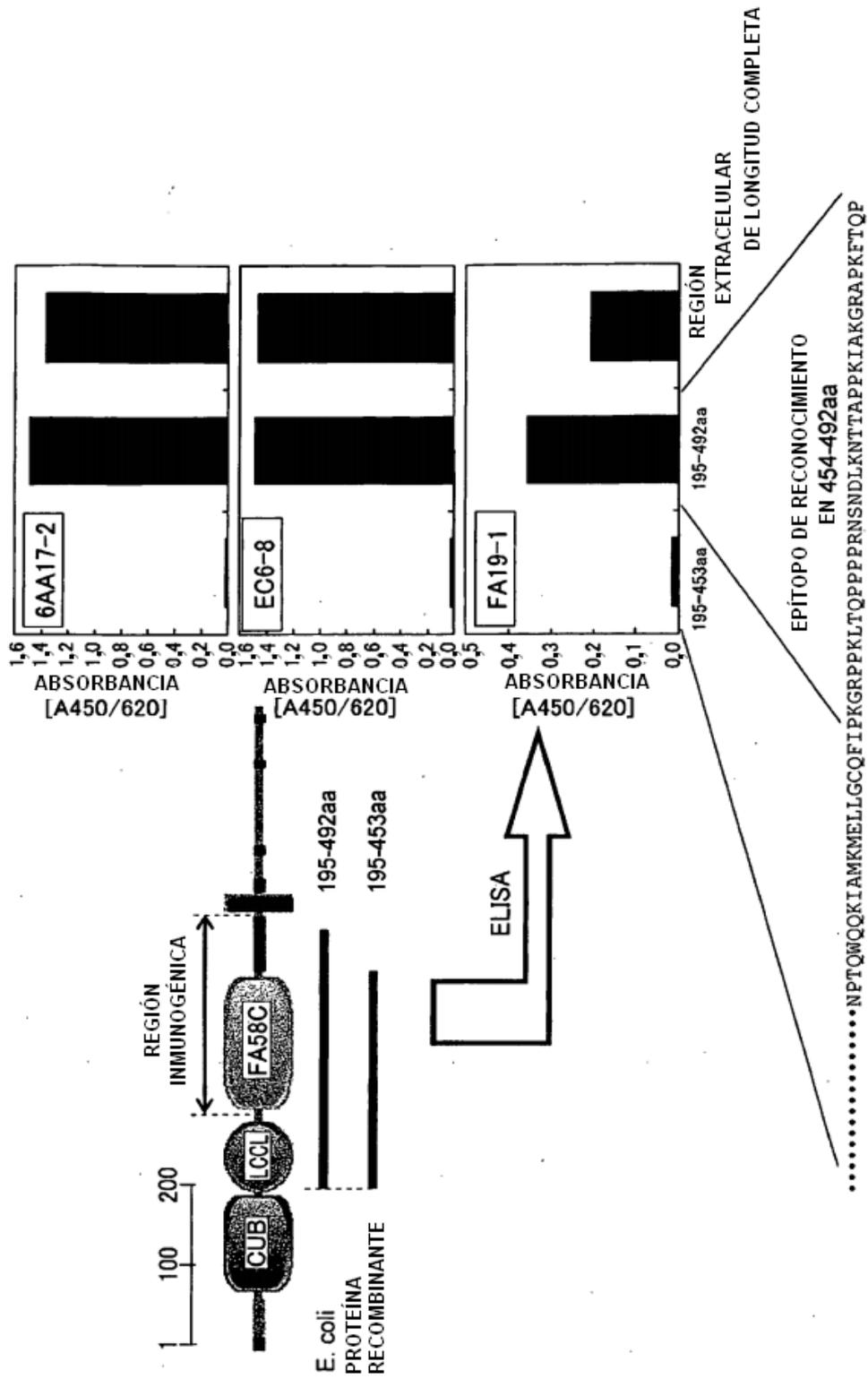


FIG. 27

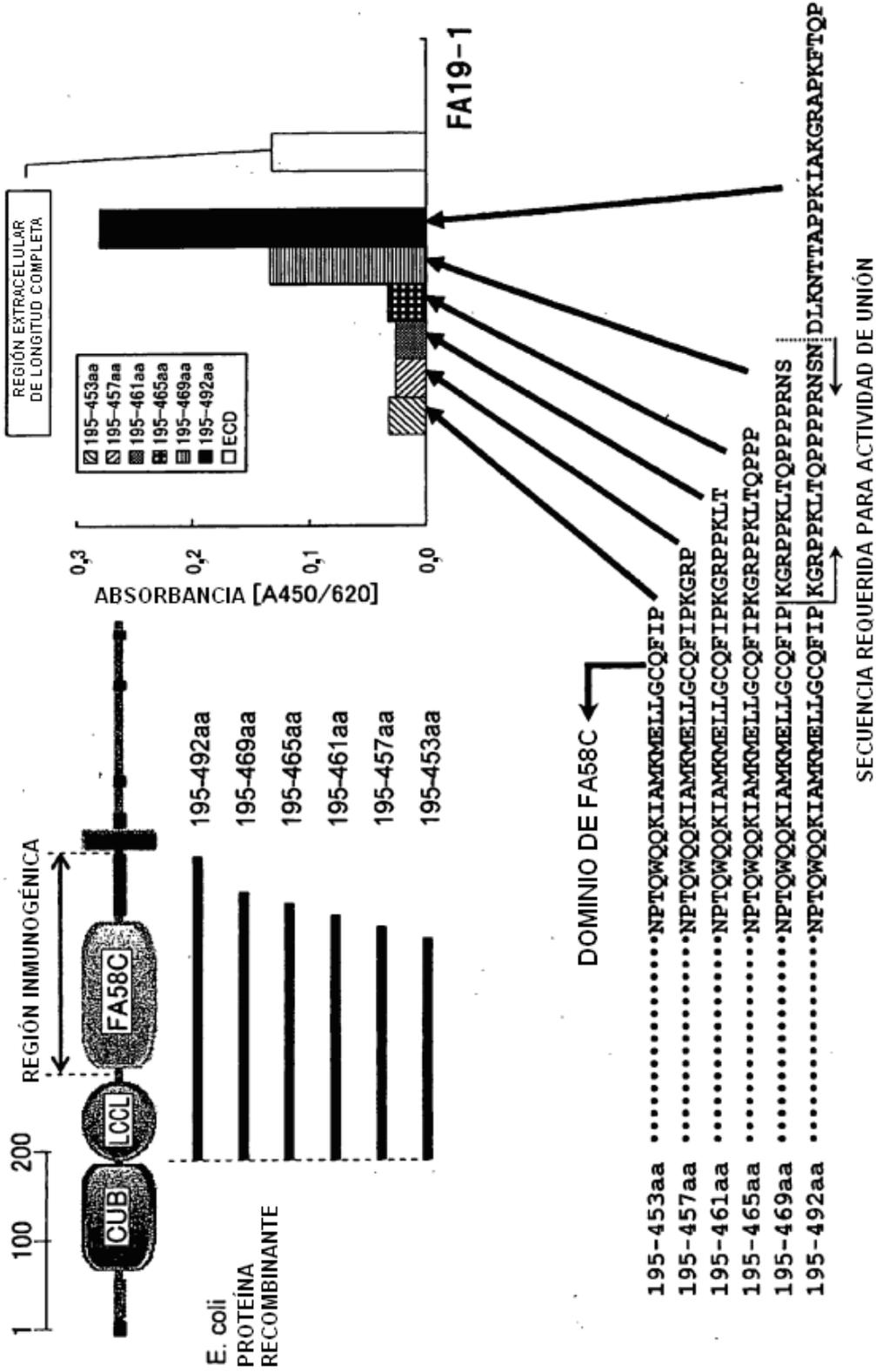


FIG. 28

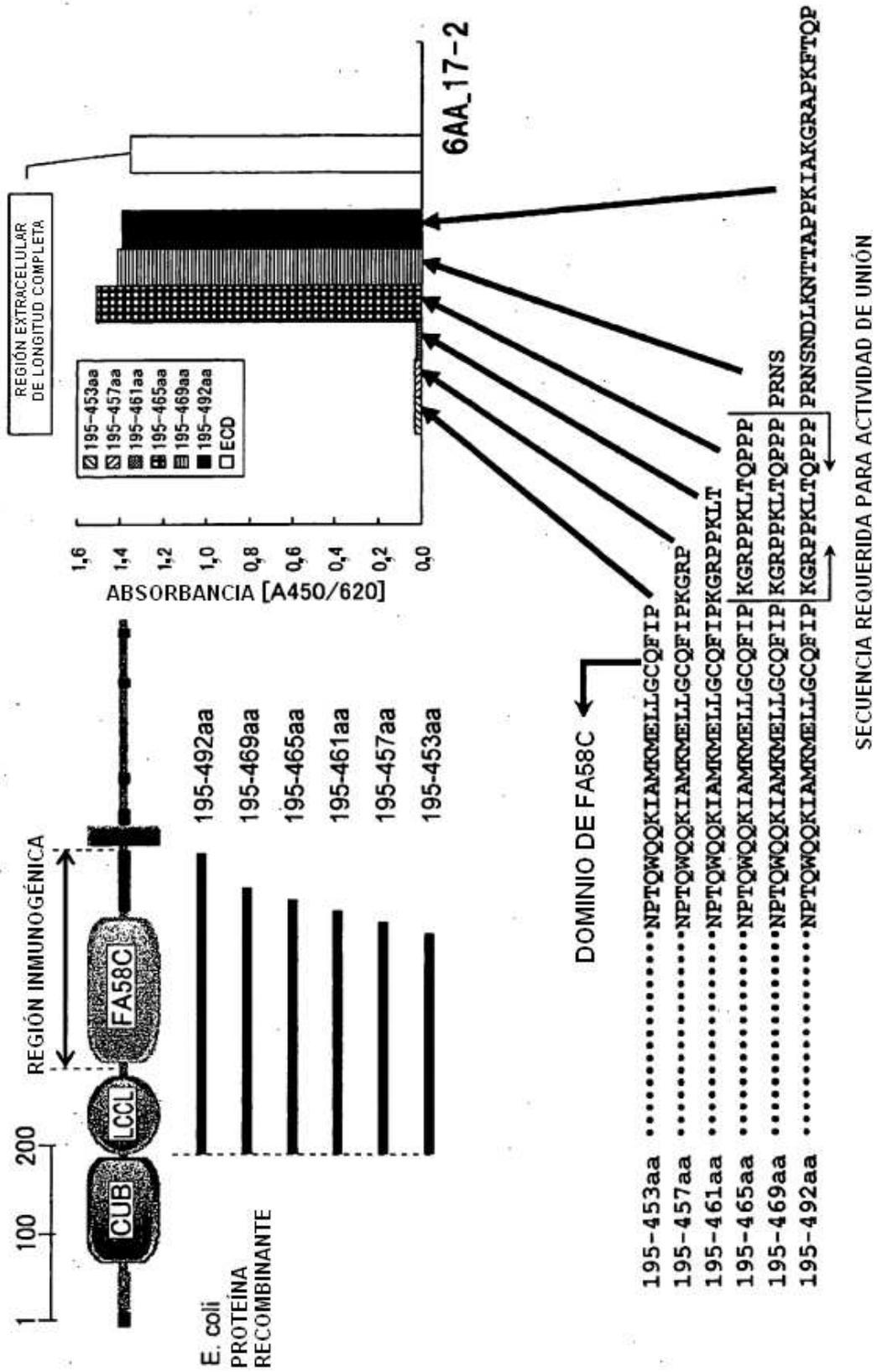


FIG. 29

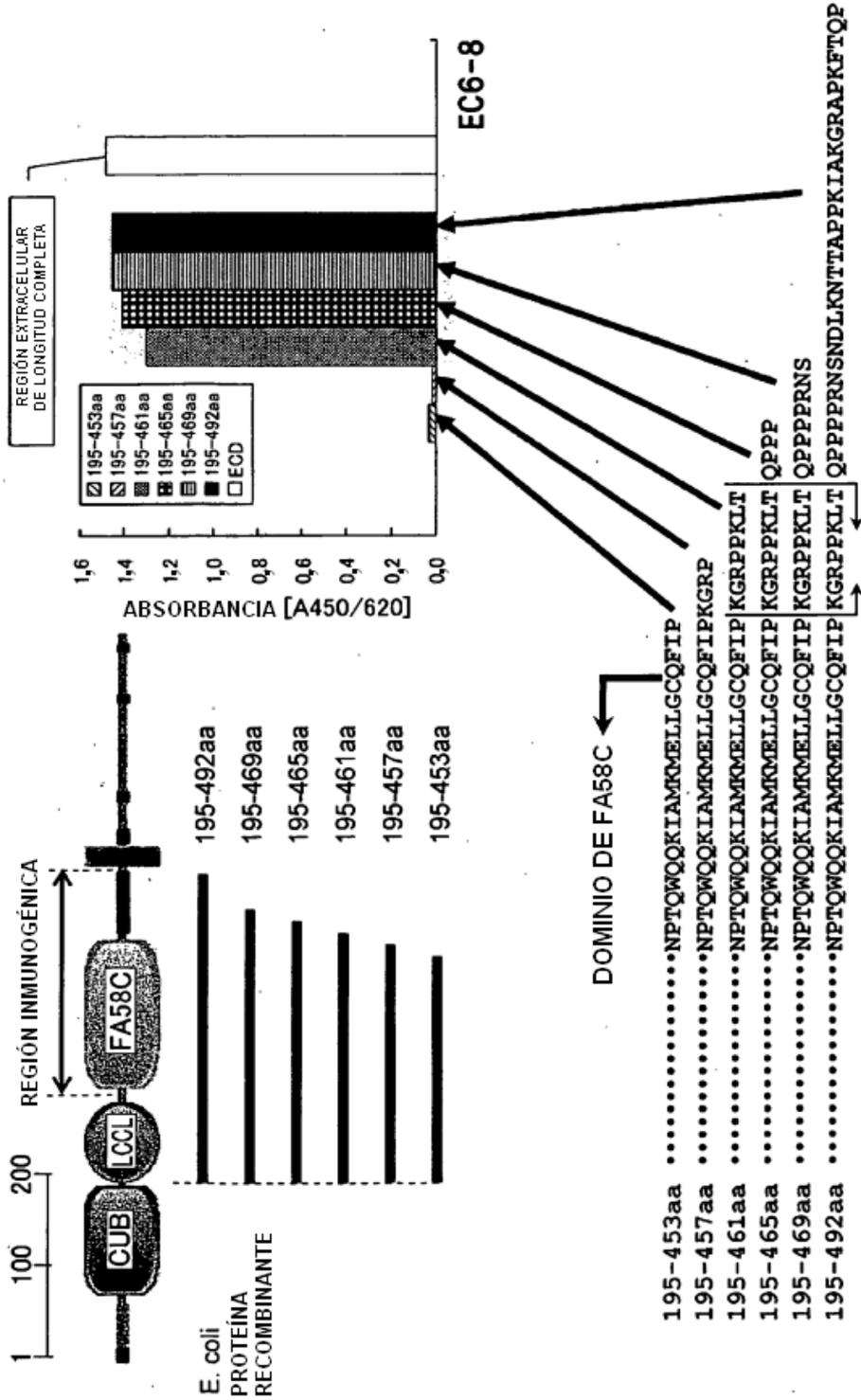


FIG. 30

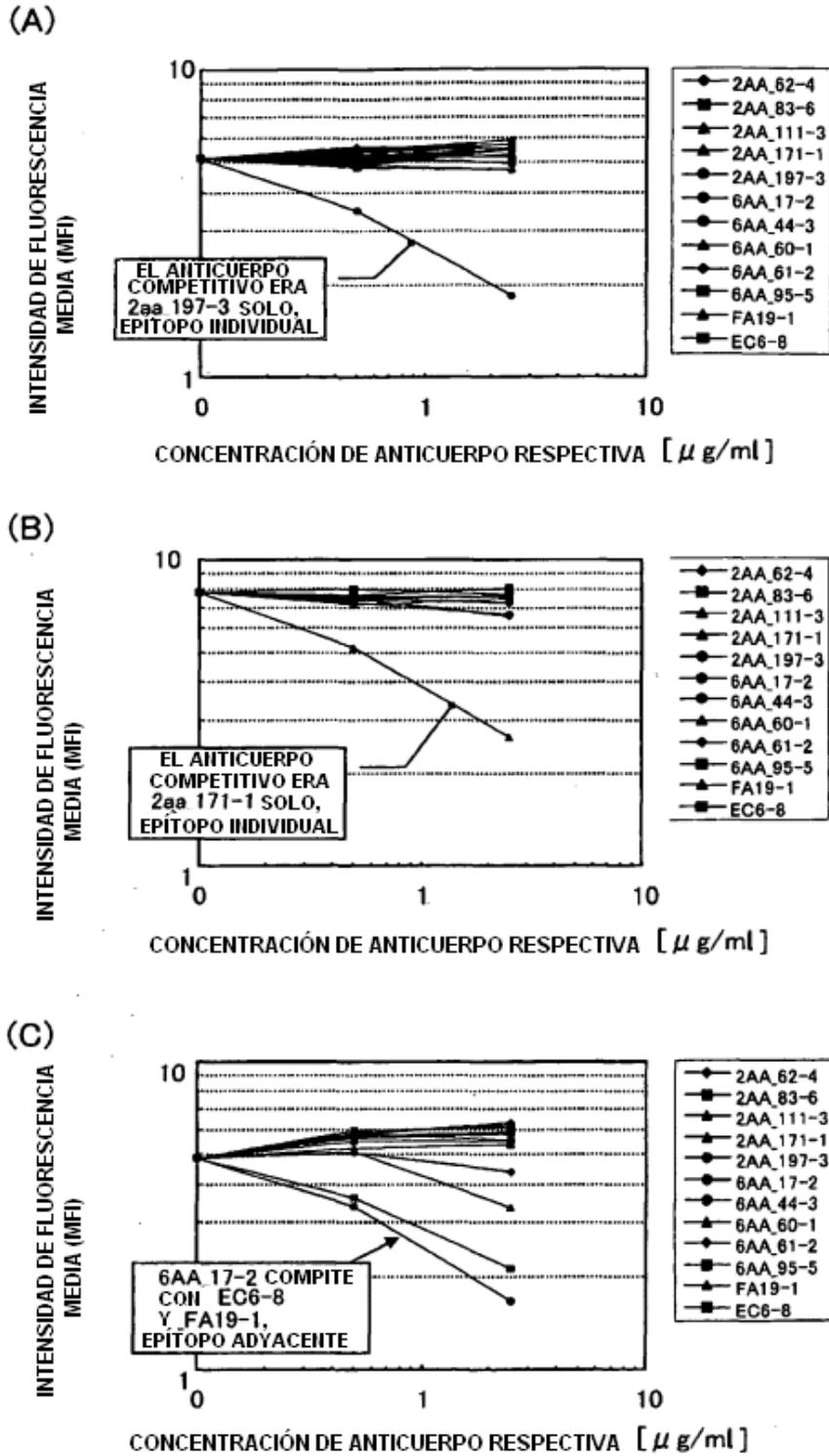


FIG. 31

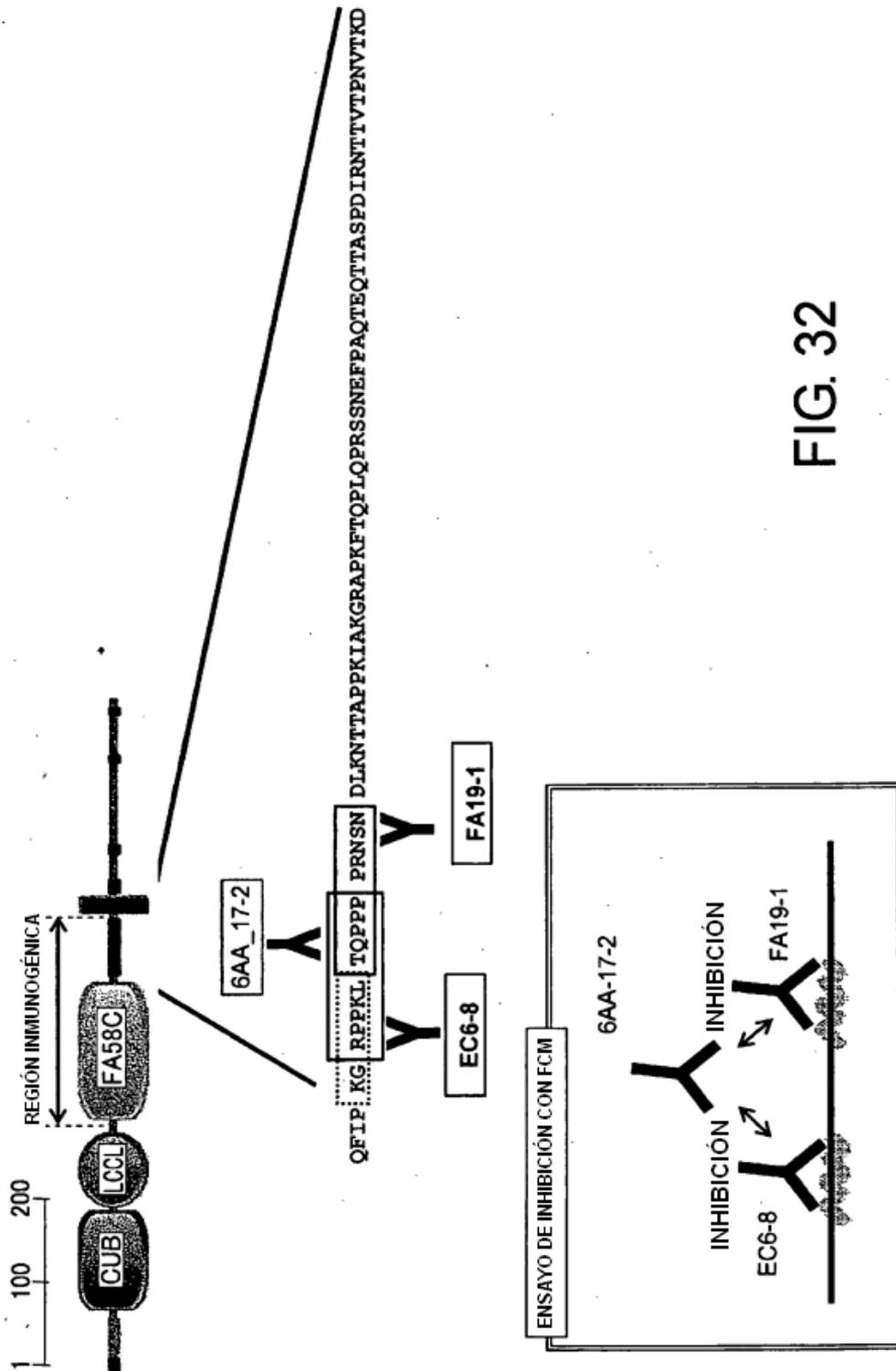


FIG. 32

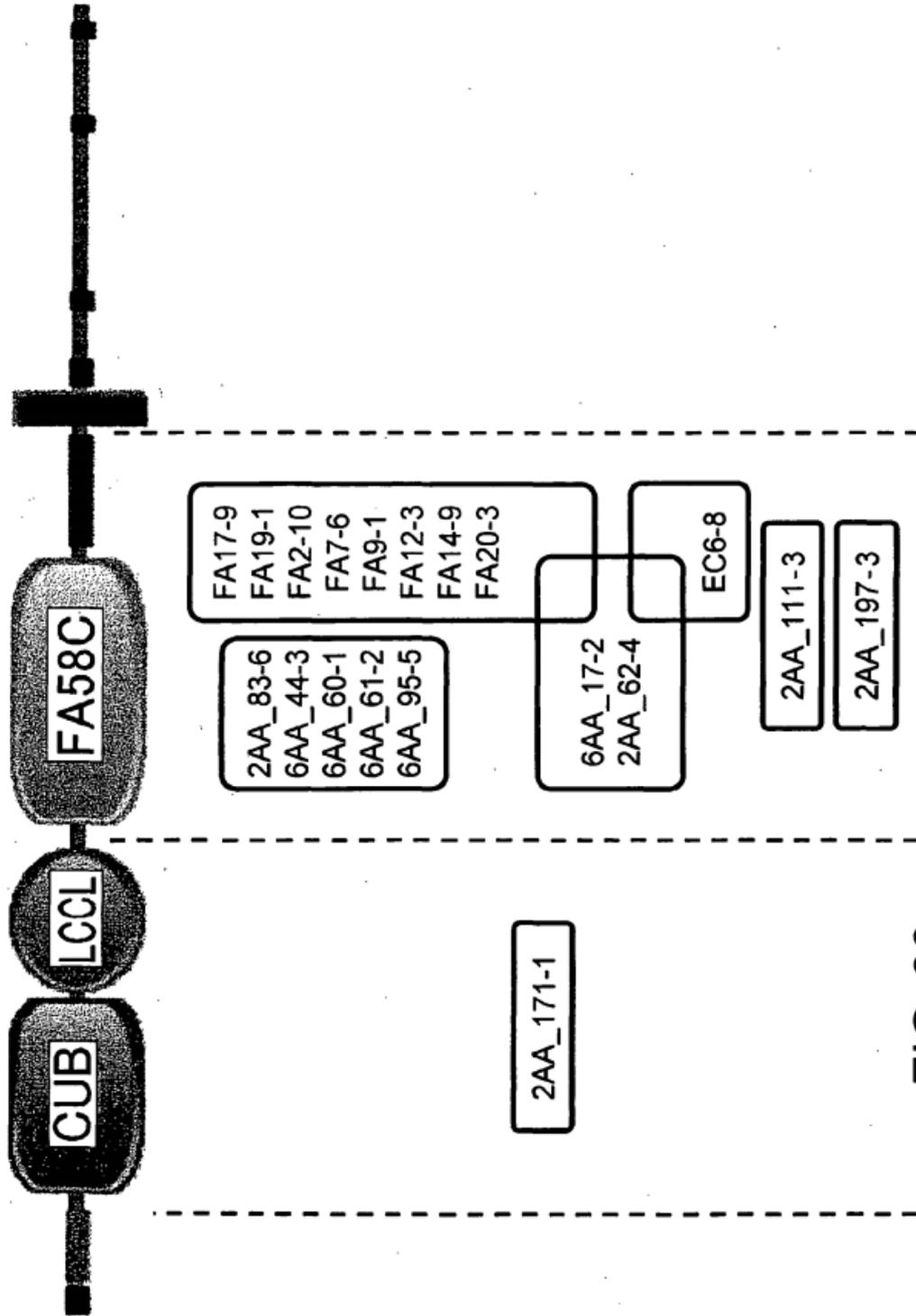


FIG. 33

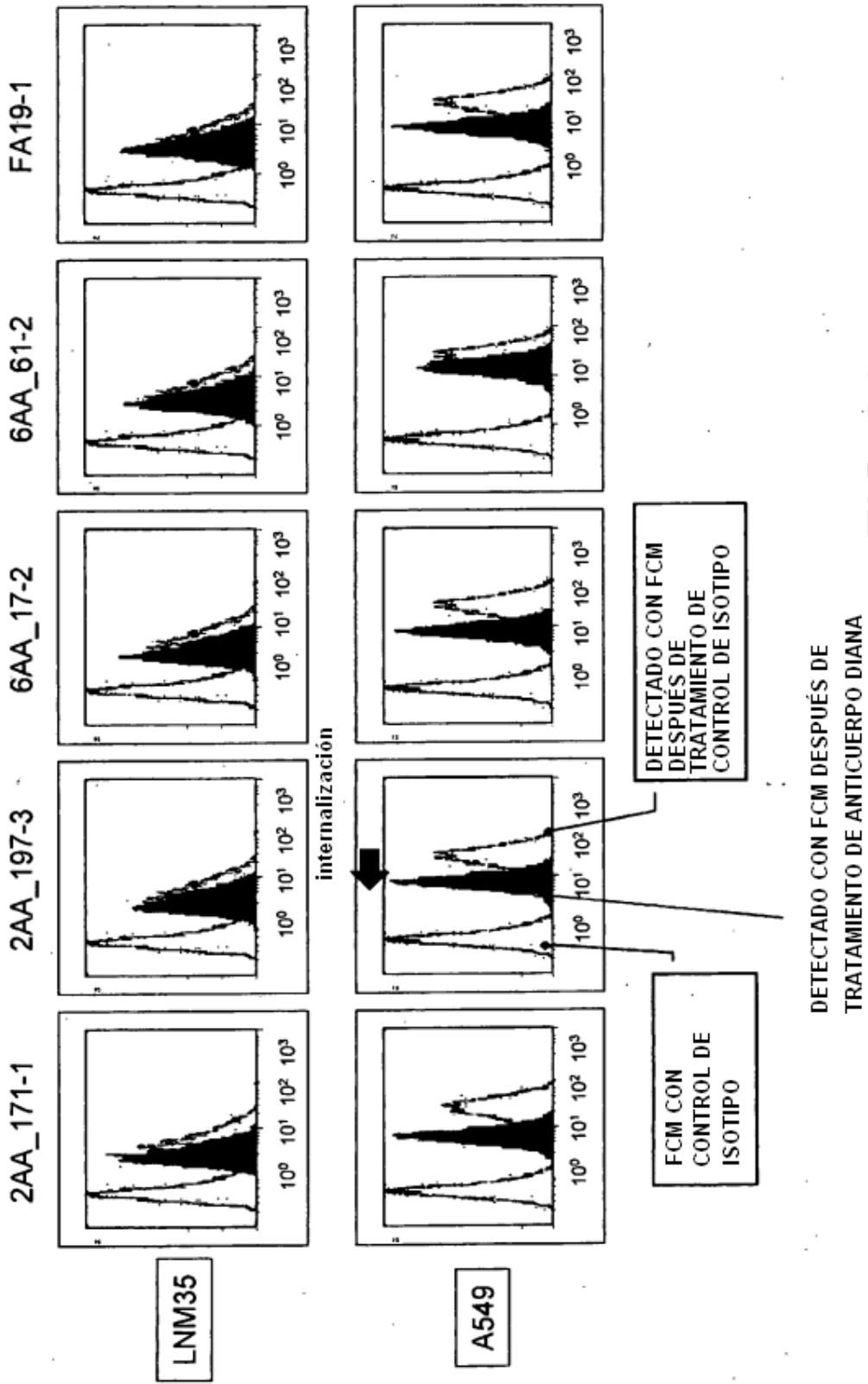


FIG. 34

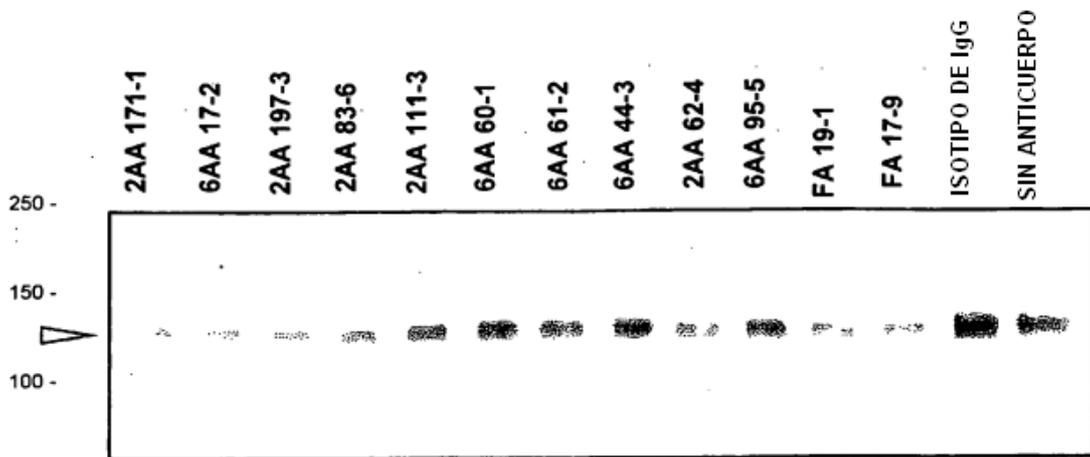


FIG. 35

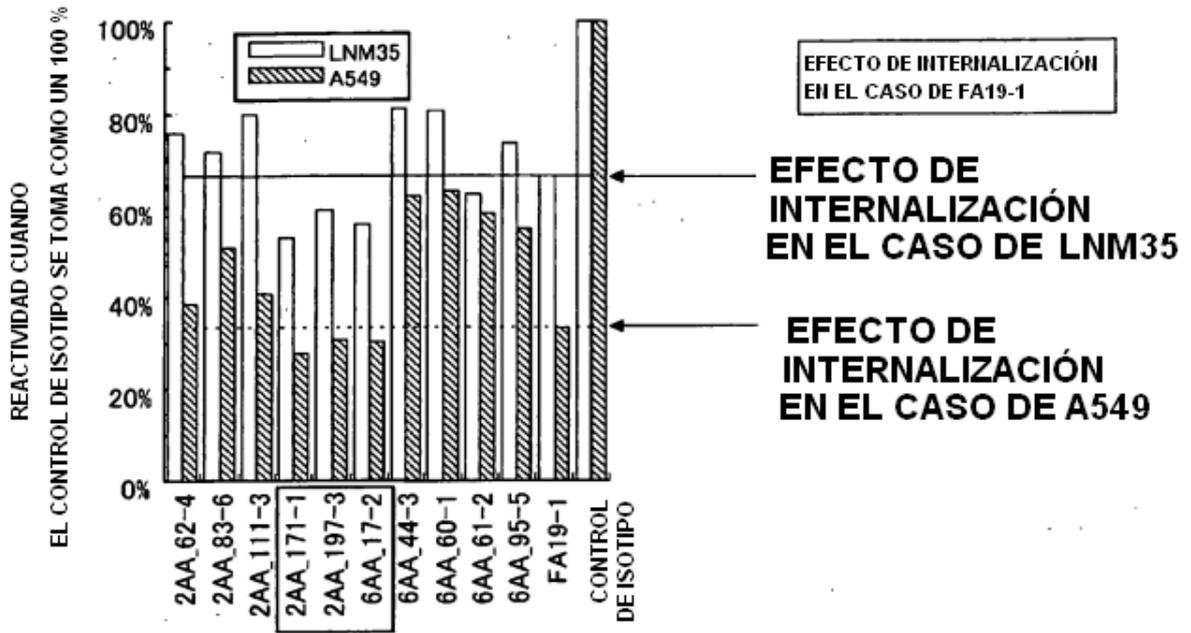


FIG. 36

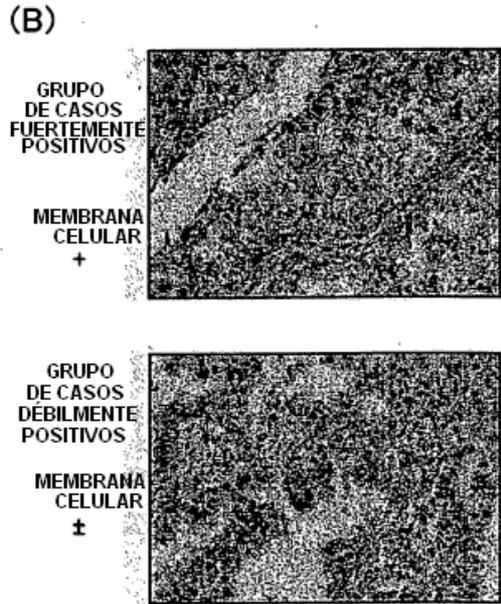
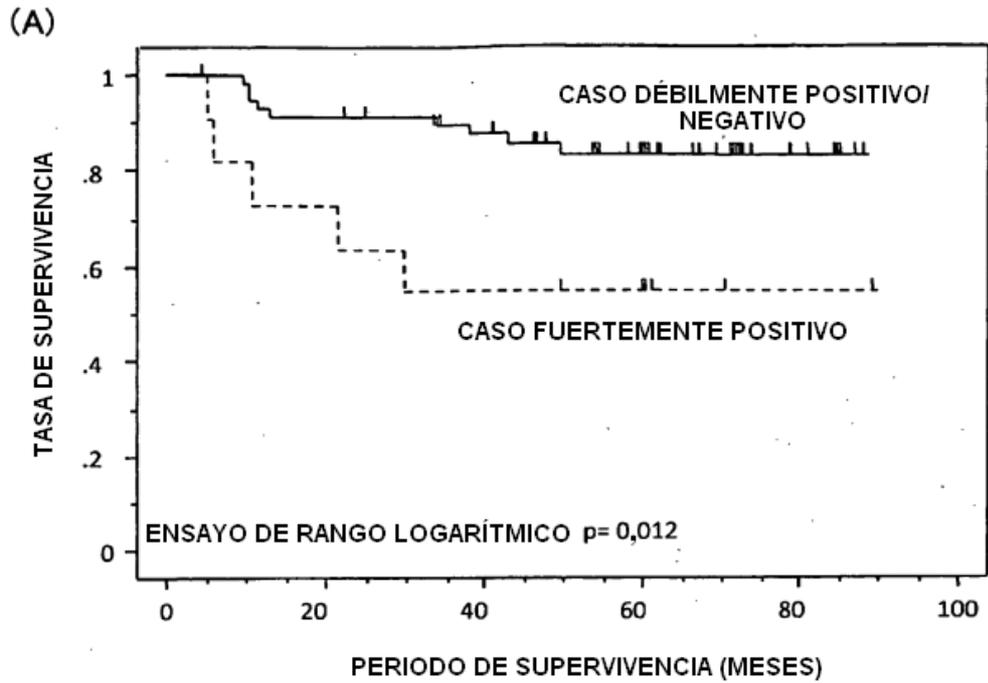


FIG. 37

6AA 17-2 CADENA PESADA

1 ATGAAATGCAGCTGGGTCCTTCCTGATGCGAGTGGTTACTGGGGTCAATTCA GAG 60
M K C S W V F F F L M A V V T G V N S E

61 GTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTTGAGGGCCAGGGGCTTAGTCAAGTTGTCC 120
V Q L Q Q S G A E L V R P G A L V K L S

121 TGCAAGCTTCGGCTTCAACATTAAA GACTACTATATGCAC TGGGTGAAGCAGAGGCCT 180
C K A S G F N I K D Y Y M H W V K Q R P

181 GAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGA TGGATTGATCCTGAGAATGATAATACTATATATGAC 240
E Q G L E W I G W I D P E N D N T I Y D

241 CCGAAGTTCCAGGGC AAGGCCAGTATAACACGACAGCAGCTCCTCCAACACACAGCCCTACCTG 300
P K F Q G K A S I T A D T S S N T A Y L

301 CACCTCAGCAGCCCTGACATCTGAGGACACTGCCGCTATTACTGTGCTAGA GCCATATGGT 360
H L S S L T S E D T A V Y Y C A R A Y G

361 TACGACGATTACTATGGAATAC TGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA 420
Y D D Y Y A M E Y W G Q G T S V T V S S

6AA 17-2 CADENA LIGERA

1 ATGGAATCACAGACTCAGGTCCTCCCTCGCTCGCTCGGGTATCTGGTACCTGTGGG 60
M E S Q T Q V F L S L L L W V S G T C G

61 AACATTATGATGACACAGTGGGCATCATCTCGGCTGTGTCTGCAGGAGAAAAGGTCACT 120
N I M M T Q S P S S L A V S A G E K V T

121 ATGAGCTGT AAGTCCAGTCAAAAGTGTTTTATACAGTTCAAAATCAGAGAAGTACTTGGCC 180
M S C K S S Q S V L Y S S N Q K N Y L A

181 TGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATCTAC TGGACTTCCACTAGG 240
W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W T S T R

241 GAATCA GGTGTCCCGGATCGCTTACAGGCGAGTGGATCTGGGACACAGATTTTACTCTTACC 300
E S G V P D R F T G S G S G T D F T L T

301 ATCAGCAGTGTCAAGCTGAAGACCTGGCAATTTTACTGT CATCAATATCTCTACTGG 360
I S S V Q A E D L A I Y Y C H Q Y L Y S

361 TACACG TTCGGAGGGGGACCAAGCTG 387
Y T F G G T K L

FIG. 38

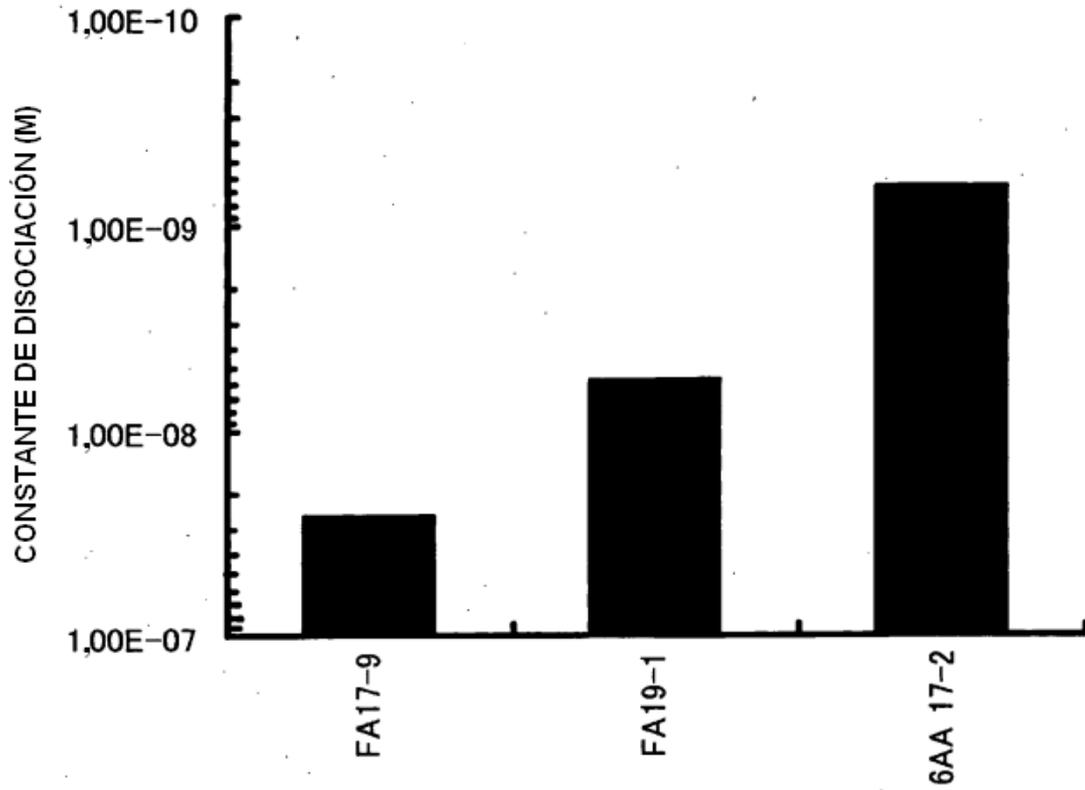


FIG. 39

(A)

Húmero de Kabat ²	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
	0123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123										
CDRs de Kabat:	=====H1==										
FA19 VH	-EVQLQDSGP	ELVKPGASVKMSCKASGYTF	ITYIMH-	IVKDKPGGLEWIGYIN-	PYNDGTYNEKFKG	EATLTS	DKSSSTAYMELSSL	TSEDSAVYYCARG	GAMYYGSNYNWSF	-----DV	MGAGTTVTVSS
FA19CDR			ITYIMH-		YIN-	PYNDGTYNEKFKG			GAMYYGSNYNWSF	-----DV	
FA19RHA	-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKYSCKASGYTF	ITYIMH-	IVRQAPGORLEWIGYIN-	PYNDGTYNEKFKG	RYVTRDTSANTAYMELSSL	KSEDTAVYYCARG	GAMYYGSNYNWSF	-----DV	MGQGLTVTSS		
U00570 FW	-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKYSCKASGYTF		IVRQAPGORLEWIG		RYVTRDTSANTAYMELSSL	KSEDTAVYYCAR			MGQGLTVTSS		
U00570	-QVQLVQSGAEVKKPKGASVKYSCKASGYTF	TNYAIIH-	IVRQAPGORLEWIGW	IN-	TASANTKCSNFG	RYVTRDTSANTAYMELSSL	KSEDTAVYYCARG	GGDTCYGGS	-----DV	MGQGLTVTSS	

(B)

<CDR1 **<=====CDR2==**

FA19-1: EVQLQDSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFITYIMHVKDKPGGLEWIGYINPYNDGTYNE

RHA : Q...V...A.VK.....V.....R.A...R.....

=====> **<=====CDR3====>**

FA19-1: KFKGEATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAMYYGSNYNWSFDVWGAGTTVTVSS

RHA : ...RV.V.R.T.AN.....K...T.....Q...L.....

FR = HOMOLOGÍA DE 67 AMINOÁCIDOS:87 AMINOÁCIDOS DE UN 77,0 %

FIG. 40

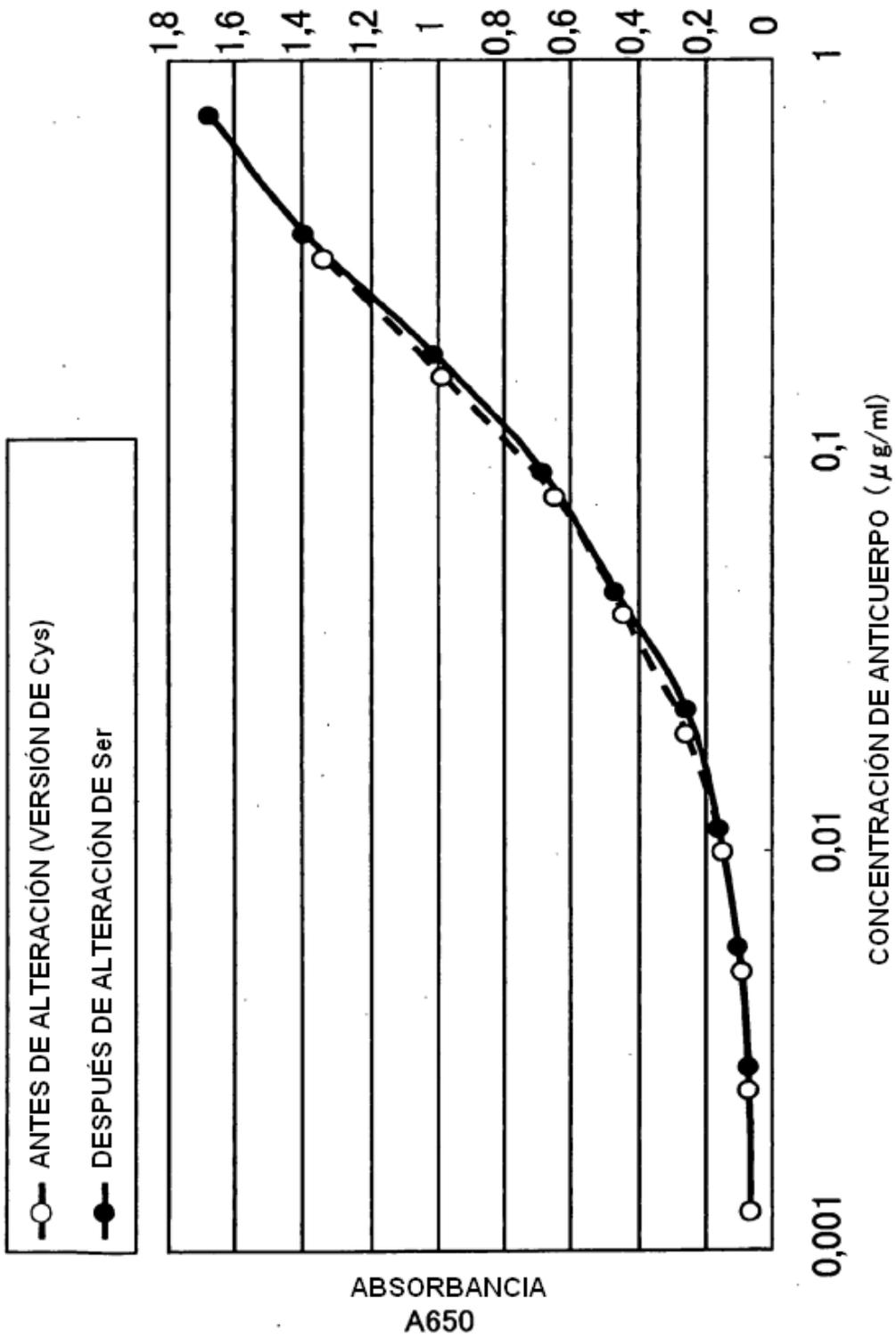


FIG. 42

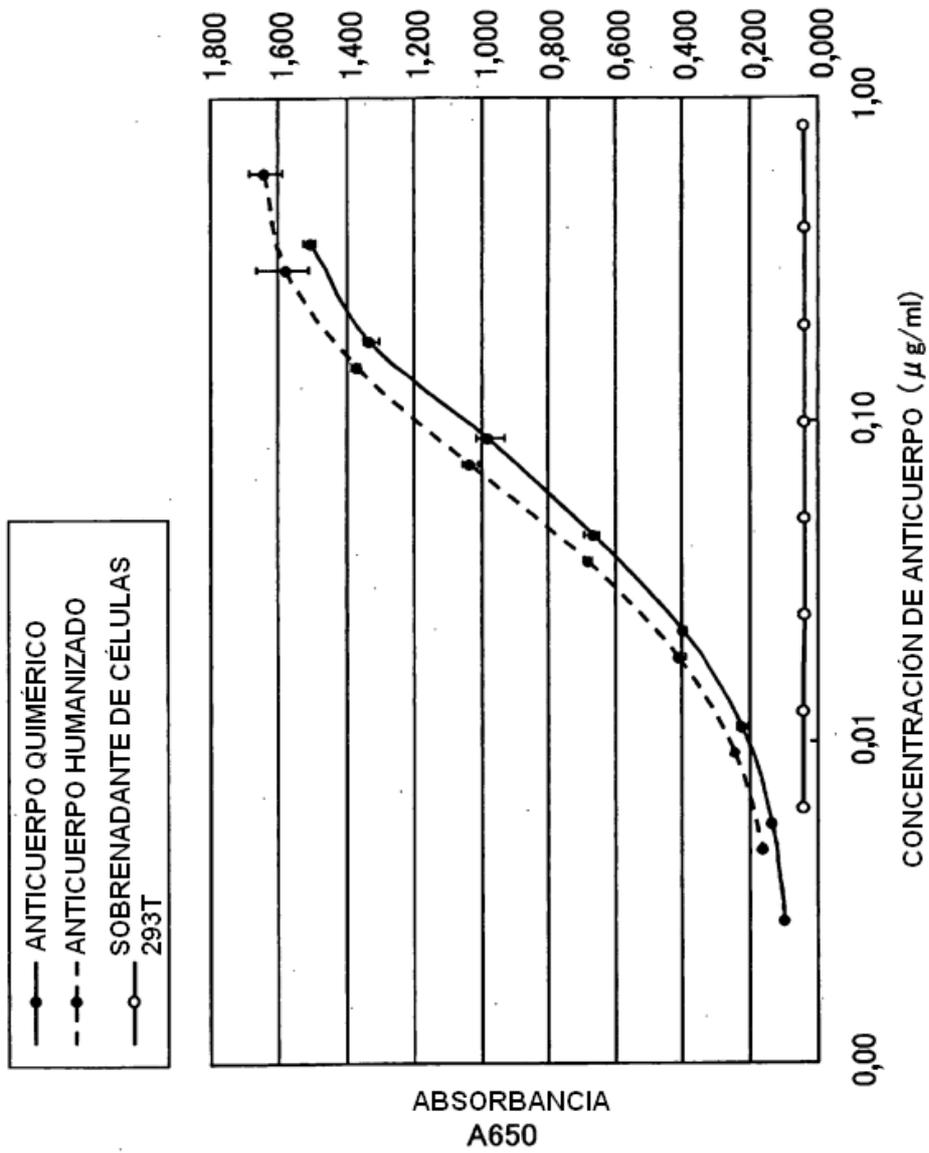


FIG. 43

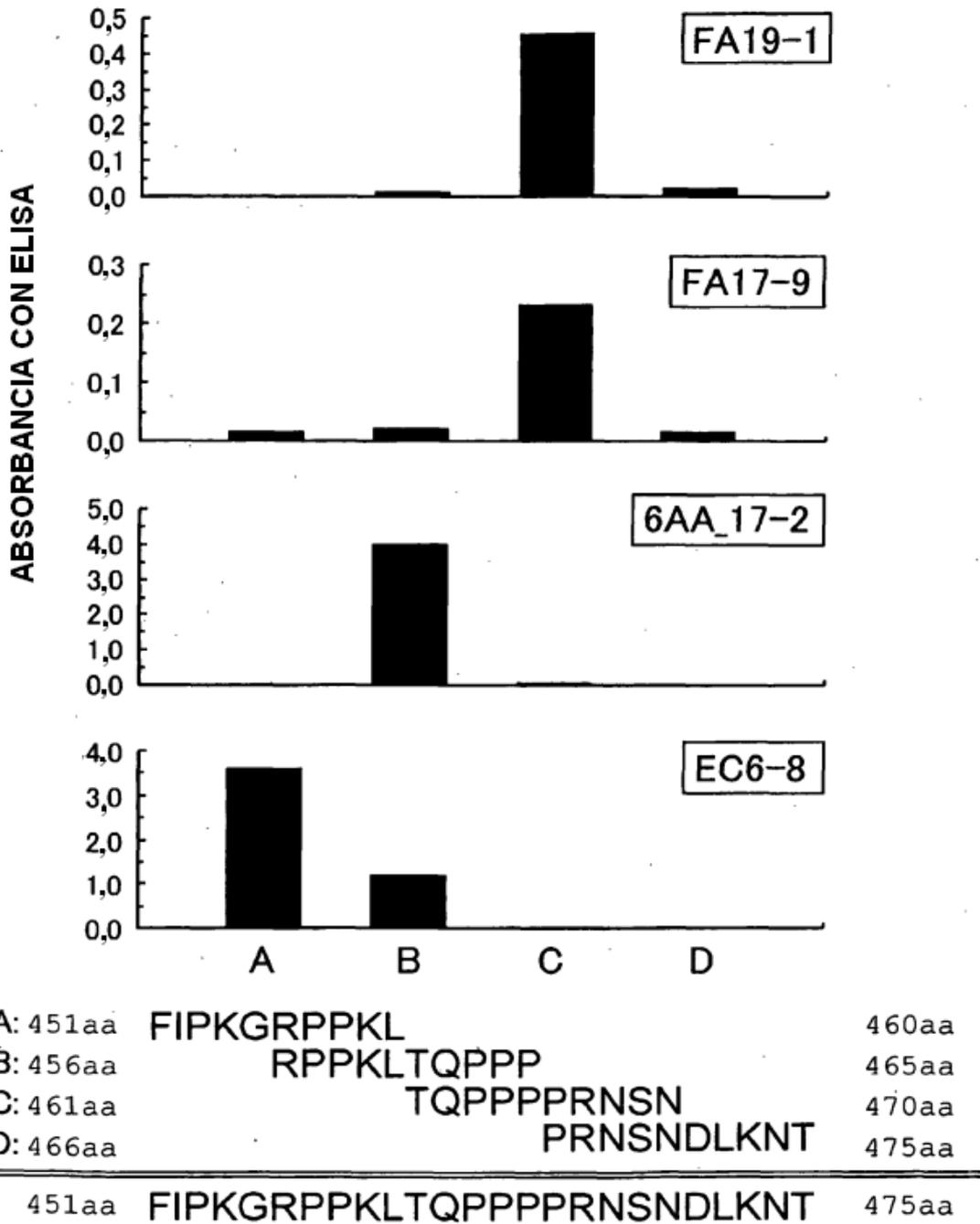


FIG. 44