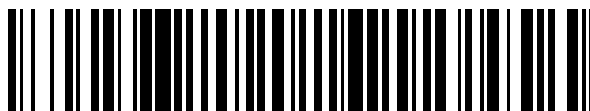


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 026**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01) A61P 17/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
A61K 45/00	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01) A61P 35/02	(2006.01)
A61P 1/18	(2006.01) C07K 16/30	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01) A61K 45/06	(2006.01)
A61P 13/08	(2006.01) C07K 16/28	(2006.01)
A61P 13/10	(2006.01) A61K 39/00	(2006.01)
A61P 13/12	(2006.01)	
A61P 15/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/JP2012/069819**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO2013018883**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12820775 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 2740798**

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

30 Prioridad:

04.08.2011 JP 2011171303

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

20.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 618 026 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacológica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer

5 Campo técnico

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

10 Técnica antecedente

El cáncer es la principal causa de muerte. Esta enfermedad se trata actualmente principalmente por terapia quirúrgica en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del reciente desarrollo de nuevas técnicas quirúrgicas o el descubrimiento de nuevos agentes anticáncer, el tratamiento del cáncer existente tiene un resultado insuficientemente mejorado, excepto para algunos tipos de cáncer. Con los recientes avances en biología molecular o inmunología del cáncer, se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente contra el cáncer, antígenos del cáncer que son reconocidos por células T citotóxicas, genes que codifican dichos antígenos del cáncer, y similares, aumentando las expectativas sobre la terapia del cáncer específica dirigida contra los antígenos del cáncer (Bibliografía No patente 1).

Para reducir los efectos secundarios de la terapia del cáncer, sería deseable que los péptidos, polipéptidos, o proteínas que se reconocen como antígenos del cáncer existieran escasamente en las células normales y existieran específicamente en células cancerosas. En 1991, Boon et al. (Ludwig Institute for Cancer Research, Bélgica) aislaron un antígeno de melanoma humano MAGE-1 que era reconocido por células T CD8 positivas mediante un método de clonación de expresión de ADNc utilizando líneas celulares cancerosas autólogas y células T reactivas al cáncer (Bibliografía No patente 2). Después, se ha informado de un método SEREX (identificación serológica de antígenos por clonación de expresión recombinante), que adopta una estrategia de clonación de expresión genética para identificar antígenos tumorales reconocidos por los anticuerpos producidos en respuesta al cáncer autólogo *in vivo* en un paciente con cáncer (Bibliografía No patente 3 y Bibliografía de Patente 1). De acuerdo con este método, se han aislado algunos antígenos del cáncer que se expresan escasamente en células normales y se expresan específicamente en el cáncer (bibliografías No patentes 4 a 9). Además, se encuentra en ensayo clínico la terapia celular utilizando inmunocitos que reaccionan específicamente con los antígenos del cáncer o la inmunoterapia específica del cáncer utilizando vacunas o similares que comprenden antígenos del cáncer que se dirigen a algunos de los antígenos del cáncer aislados.

En años recientes, han aparecido en el mundo varios fármacos con anticuerpos para el tratamiento de cáncer que se dirigen a las proteínas antigénicas en las células cancerosas. Esos fármacos han captado la atención debido a su cierta eficacia como agentes terapéuticos específicos del cáncer. Una gran mayoría de proteínas antigénicas a las que se dirigen los fármacos, sin embargo, se expresan también en células normales. Como resultado de la administración de anticuerpos, se dañan las células normales que expresan los antígenos así como las células cancerosas, dando como resultado efectos secundarios de manera desventajosa. Por lo tanto, si se pudieran identificar los antígenos del cáncer que se expresan específicamente en la superficie de las células cancerosas y se pudieran utilizar como fármacos los anticuerpos que se dirigen a los antígenos, se puede esperar que estos fármacos con anticuerpos consigan el tratamiento con menos efectos secundarios.

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

Listado de citas

Bibliografía de Patentes

Bibliografía de Patente 1: Patente de EE. UU. Nº 5698396

Bibliografía de Patente 2: Documento WO 2010/016526

Bibliografía No patentes

Bibliografía No patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, Vol. 24, p. 511-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)

Bibliografía No patente 2: Bruggen P. et al., Science, 254: 1643-1647 (1991)

Bibliografía No patente 3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11810-11813 (1995)

5 Bibliografía No patente 4: Int. J. Cancer, 72: 965-971 (1997)

Bibliografía No patente 5: Cancer Res., 58: 1034-1041 (1998)

10 Bibliografía No patente 6: Int. J. Cancer, 29: 652-658 (1998)

Bibliografía No patente 7: Int. J. Oncol., 14: 703-708 (1999)

Bibliografía No patente 8: Cancer Res., 56: 4766-4772 (1996)

15 Bibliografía No patente 9: Hum. Mol. Gene 6: 33-39, 1997

Sumario de la invención

Problema técnico

20 Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo que se dirija a la CAPRIN-1 que se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y que tenga una mejor actividad antitumoral que los anticuerpos convencionales, y proporcionar el anticuerpo para su uso como agente terapéutico y/o preventivo contra el cáncer.

25 Solución al problema

La presente invención tiene los siguientes aspectos:

30 La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica contra una proteína CAPRIN-1, comprendiendo el anticuerpo una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, y 11, y una composición farmacéutica y una combinación farmacéutica que comprenden el mismo como principio activo, así como una composición farmacéutica y una combinación farmacéutica para su uso en un método para tratar y/o prevenir el cáncer, todas ellas definidas en las reivindicaciones.

40 En una realización de la presente invención, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, o un anticuerpo biespecífico.

45 Efectos ventajosos de la invención

El anticuerpo contra CAPRIN-1 que se utiliza en la presente invención daña las células cancerosas. Por lo tanto, el anticuerpo contra CAPRIN-1 es útil en el tratamiento y/o prevención del cáncer.

50 Descripción de las realizaciones

55 El anticuerpo contra el polipéptido CAPRIN-1 que se utiliza en la presente invención se puede examinar en cuanto a su actividad antitumoral, como se describe posteriormente, examinando *in vivo* la inhibición de la proliferación tumoral en un animal que alberga un cáncer o examinando *ex vivo* la presencia o ausencia de actividad citotóxica mediada por inmunocitos o complemento que presenta el anticuerpo contra las células tumorales que expresan el polipéptido.

60 El anticuerpo contra CAPRIN-1 que se utiliza en la presente invención es un anticuerpo monoclonal, y puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda ejercer una actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, por ejemplo, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos humanos, y sus fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv. Estos anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden preparar por métodos que son conocidos en general por los expertos en la técnica. En el caso de un sujeto humano, es deseable un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir el rechazo.

65

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

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

De aquí en adelante, se describirá la preparación de antígeno, la preparación de anticuerpo, y una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

<Preparación de antígenos para la preparación de anticuerpos>

Las proteínas o fragmentos que se utilizan como antígenos sensibilizantes para obtener el anticuerpo contra CAPRIN-1 no están limitados por el tipo de animal que sirve como origen, incluyendo seres humanos, perros, ganado bovino, caballos, ratones, ratas y pollos. Las proteínas o los fragmentos de las mismas, sin embargo, se seleccionan preferentemente en vista de la compatibilidad con las células parentales para su uso en una fusión celular. En general, se prefieren las proteínas derivadas de mamíferos. Particularmente, se prefieren las proteínas derivadas de seres humanos. Por ejemplo cuando la CAPRIN-1 es humana, se pueden utilizar las proteínas CAPRIN-1 humanas, péptidos parciales de las mismas, o células que expresan CAPRIN-1 humana.

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y las homólogas de las mismas se pueden obtener por ejemplo, produciendo un acceso en GenBank (NCBI, EE. UU) y utilizando el algoritmo BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993; y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997).

En la presente invención, en referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 o 3) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 o 4) de la CAPRIN-1 humana, las dianas son ácidos nucleicos o proteínas que consisten en secuencias que tienen una identidad de secuencia del 70 % al 100 %, preferentemente del 80 % al 100 %, más preferentemente del 90 % al 100 %, más preferentemente del 95 % al 100 %, por ejemplo, del 97 % al 100 %, 98 % al 100 %, 99 % al 100 %, o 99,5 % al 100 % con la secuencia de nucleótidos o secuencia de aminoácidos de la ORF o la parte madura de la referencia. En este contexto, la expresión “% de identidad de secuencia” significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos idénticos (o bases) respecto al número total de aminoácidos (o bases) cuando se alinean dos secuencias de manera que se pueda alcanzar el máximo grado de similitud o identidad con o sin la introducción de huecos.

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

Los polipéptidos que comprenden las proteínas CAPRIN-1 humanas anteriores y péptidos parciales de las mismas se pueden sintetizar de acuerdo con métodos de síntesis química, por ejemplo, los métodos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experimentation Course in English) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japan), 1981). También, estos polipéptidos se pueden sintetizar por métodos de rutina utilizando distintos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. De manera alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar utilizando estrategias de modificación genética conocidas en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) y que se incorporan en vectores de expresión, que se introducen entonces en células huésped de manera que las células huésped produzcan los polipéptidos. De esta manera, se pueden obtener los polipéptidos de interés.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar fácilmente por estrategias de modificación genética conocidas en la técnica o métodos de rutina que utilizan sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el comercio. Por ejemplo, se puede preparar un ADN que comprenda la secuencia de nucleótidos del gen de CAPRIN-1 humana por PCR utilizando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como matriz y un par de cebadores diseñados de manera que sean capaces de amplificar la secuencia de nucleótidos que incluye, pero no se limita a, 30 ciclos de cada una de las etapas de reacción implicadas que consisten en 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos a 1 minuto (hibridación), y 72 °C durante 2 minutos (elongación) utilizando la termotolerancia de la ADN polimerasa (por ejemplo, Taq polimerasa, Pfu polimerasa) y un tampón de PCR que contiene Mg²⁺, seguido por una reacción de 72 °C durante 7 minutos. La estrategia de PCR, condiciones, etc. se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (particularmente, el capítulo 15).

También se pueden preparar sondas o cebadores apropiados basándose en la información de las secuencias de nucleótidos del gen CAPRIN-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRIN-1, y se utilizan en la exploración, por ejemplo, de una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, dicha biblioteca de ADNc se produce a partir de células, órganos o tejidos que expresan las proteínas CAPRIN-1.

5 Ejemplos de dichas células o tejidos incluyen las células o tejidos derivados de cánceres o tumores tales como el cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma. Estas operaciones, incluyendo la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración de la biblioteca de
10 ADNc, y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2ª edición, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989), y Ausubel et al. (ibíd.). Los ADN que codifican las proteínas CAPRIN-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas se pueden obtener del ADN así obtenido.

15 Las células huésped pueden ser cualquier célula capaz de expresar los polipéptidos anteriores. Ejemplos de células procariotas incluyen, pero no se limitan a, *E. coli*. Ejemplos de células eucariotas incluyen, pero no se limitan a: células de mamífero, tal como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una línea celular de riñón embrionario humano HEK293; una línea celular cutánea embrionaria de ratón NIH3T3; células de levadura tales como células de levadura en germinación y células de levadura de fisión; células de gusano de seda;
20 y células de huevos de *Xenopus*.

En el caso del uso de células procariotas como células huésped, los vectores de expresión que se utilizan tienen un origen que permite la replicación en las células procariotas, un promotor, un sitio de unión ribosómico, un sitio de multiclonación, un terminador, un gen de resistencia a fármacos, un gen complementario auxotrópico, etc. Ejemplos
25 de los vectores de expresión para *E. coli* pueden incluir la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET, y sistemas de expresión pGEX. Los ADN que codifican los polipéptidos anteriores se pueden incorporar en dichos vectores de expresión, con los que se transforman entonces las células huésped, seguido por el cultivo de los transformantes obtenidos de manera que se expresen los polipéptidos codificados por los ADN en las células huésped procariotas. A este respecto, los polipéptidos se pueden expresar como proteínas de fusión con otras
30 proteínas.

En el caso del uso de células eucariotas como células huésped, se utilizan vectores de expresión para células eucariotas que tienen un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición poli(A), etc. como vectores de expresión. Ejemplos de dichos vectores de expresión pueden incluir vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL,
35 pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3, y pYES2. De la misma manera que anteriormente, se pueden incorporar los ADN que codifican los polipéptidos anteriores en dichos vectores de expresión, con los que se transforman entonces las células huésped eucariotas, seguido por el cultivo de los transformantes obtenidos de manera que se expresen los polipéptidos codificados por los ADN en las células huésped eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/VS-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, o pEGFP-C1, los polipéptidos se pueden
40 expresar como distintas proteínas de fusión marcadas con un marcador His (por ejemplo, (His)₆ – (His)₁₀), marcador FLAG, marcador myc, marcador HA, GFP, o similares.

Los vectores de expresión se pueden introducir en las células huésped utilizando métodos bien conocidos como electroporación, un método con fosfato de calcio, un método de liposomas, un método de DEAE dextrano,
45 microinyección, infección vírica, lipofección, y unión con péptidos de penetración celular.

El polipéptido de interés se puede aislar y purificar a partir de las células huésped por una combinación de operaciones de separación que se conocen en la técnica. Ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con un desnaturizante (por ejemplo, urea) o un detergente, ultrasonificación, digestión enzimática,
50 precipitación proteica con sales, fraccionamiento y precipitación en disolvente, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad, y cromatografía de fase inversa.

<Estructura del anticuerpo>

55 Los anticuerpos habitualmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Los anticuerpos, excepto la IgM, son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa compuestas cada una de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada por medio de un único enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas varía entre los diferentes
60 isotipos de inmunoglobulinas. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras también tienen enlaces disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido por una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (región VL) en un extremo y tiene una única región constante en el otro extremo. La región constante de cadena ligera se alinea con la primera región constante de cadena pesada. Mientras que el dominio variable de cadena ligera se alinea con el dominio variable de cadena pesada. Unas regiones particulares llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) en los dominios variables del anticuerpo presentan variabilidad específica y dan lugar a la especificidad de unión del anticuerpo. Las
65

partes relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables de cadena pesada y ligera completos comprenden cada uno cuatro FR conectadas por medio de tres CDR. Estas tres CDR se denominan CDRH1, CDRH3, y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la cadena pesada. De igual manera, las CDR se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR de cada cadena se mantienen próximas entre ellas por las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR de la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión antígeno-anticuerpo, pero presentan varias funciones efectoras, por ejemplo, la implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada o la unión a un receptor Fc γ , la tasa de semivida/aclaramiento mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn), y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada de complemento.

<Preparación de anticuerpo>

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

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo para unirse al antígeno CAPRIN-1 *in vivo*. Por medio de dicha unión, el anticuerpo ejerce la función de dañar (por ejemplo, destruir, suprimir o revertir) el tumor. Específicamente, el anticuerpo que se utiliza en la presente invención no está limitado por su tipo siempre que el anticuerpo pueda dañar los tumores tales como el cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma como resultado de la unión a la proteína CAPRIN-1.

En la presente invención, el anticuerpo no está limitado por su tipo siempre que el anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal, y ejemplos del mismo incluyen, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos o triacuerpos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). También, el anticuerpo es cualquier clase de molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA, IgD, o IgY, o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, o IgA2.

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

De aquí en adelante, se presentarán ejemplos de preparación de distintos anticuerpos monoclonales.

Por ejemplo, se administran líneas de cáncer de mama SK-BR-3 que expresan CAPRIN-1 a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de cada ratón. Tras la separación de las células esplénicas, se fusionan las células con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto anti-proliferativo sobre células cancerosas se seleccionan de entre las células de fusión (hibridomas) que se obtienen. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto anti-proliferativo de una célula cancerosa se aíslan y se cultivan. El anticuerpo de interés se puede preparar por purificación del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un método general de purificación por afinidad.

Se pueden preparar hibridomas que produzcan anticuerpos monoclonales, por ejemplo, de la siguiente manera: primero, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización implica generalmente la inyección por vía intraperitoneal o subcutánea de los antígenos sensibilizantes a los mamíferos. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen o se suspenden en PBS (solución salina tampón fosfato), solución salina fisiológica, o similares en una cantidad apropiada y entonces se mezcla, si se desea, con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante completo de Freund. Tras la emulsión, la emulsión resultante se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 21 días. De manera alternativa, se puede utilizar un vehículo apropiado para la inmunización con los antígenos sensibilizantes.

Tras la confirmación de un aumento en el nivel del anticuerpo deseado en el suero del mamífero inmunizado de esta manera, se recolectan los inmunocitos del mamífero y se someten a fusión celular. Ejemplos preferidos de los inmunocitos incluyen particularmente las células esplénicas.

Se utilizan células de mieloma de mamífero como pareja de células parentales que se van a fusionar con los inmunocitos. Se conocen en la técnica varias líneas celulares, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), y R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133), se utilizan preferentemente como células de mieloma.

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

5 Más específicamente, la fusión celular se lleva a cabo, por ejemplo, en presencia de un promotor de fusión celular en un medio nutritivo convencional. Por ejemplo, se utiliza el polietilenglicol (PEG) o la hemoaglutinación por virus de Japón (HVJ) como promotor de fusión. Si se desea, se puede añadir además un auxiliar como el dimetil sulfoxido con el fin de aumentar la eficacia de fusión.

10 La relación entre los inmunocitos y las células de mieloma que se utilizan se puede fijar arbitrariamente. Por ejemplo, la cantidad de inmunocitos se fija preferentemente en 1 a 10 veces la cantidad de células de mieloma. Ejemplos del medio que se puede utilizar en la fusión celular incluye el medio RPMI1640 y MEM adecuados para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma así como los medios convencionales para su uso en este tipo de cultivo celular. Además, se puede utilizar un suero suplementario tal como suero fetal bovino (FCS) en combinación con estas
15 células.

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

Los hibridomas obtenidos de esta manera se cultivan en un medio selectivo convencional, por ejemplo un medio
25 HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina) para la selección. El cultivo en el medio HAT continúa durante un periodo (habitualmente, varios días a varias semanas) suficiente para la muerte de las células distintas del hibridoma de interés (células no fusionadas). Posteriormente, los hibridomas que producen el anticuerpo de interés se exploran y se clonan como clones únicos por un método de dilución limitante convencional.

30 Además de dicha obtención de los hibridomas por inmunización de animales no humanos con antígenos, se pueden obtener los hibridomas que producen anticuerpos humanos que tengan la actividad deseada (por ejemplo, actividad anti-proliferativa celular) sensibilizando linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas *in vitro* y fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas del ser humano capaces de dividirse permanentemente, por
35 ejemplo, U266 (Nº de acceso TIB 196).

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales que se preparan de esta manera se pueden sub-cultivar en un medio convencional y también se pueden almacenar durante un largo periodo en nitrógeno líquido.

40 Específicamente, los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados se utilizan como antígenos sensibilizantes en la inmunización de acuerdo con un método de inmunización convencional. Los inmunocitos obtenidos se fusionan con células parentales conocidas en la técnica de acuerdo con un método de fusión celular convencional. Las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) se pueden explorar por un método de exploración convencional para preparar el anticuerpo de interés.

45 En este contexto, por ejemplo, se conocen los ratones KM (Kirin Pharma Co., Ltd. /Medarex) y ratones Xeno (Amgen Inc.) como ratones que producen anticuerpos humanos (por ejemplo, Publicaciones Internacionales Nº WO02/43478 y WO02/092812). Se pueden obtener anticuerpos policlonales completamente humanos a partir de la sangre de dichos ratones inmunizados con proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de las mismas. De manera alternativa, se
50 pueden aislar las células esplénicas de los ratones inmunizados de esa manera y fusionarlas con células de mieloma. De esta manera se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos.

Los antígenos se pueden preparar de acuerdo con, por ejemplo, un método que utilice células animales (Publicación de Patente JP (Kohyo) Nº 2007-530068) o un método que utilice un baculovirus (por ejemplo, la Publicación Internacional Nº WO98/46777). Los antígenos que tengan baja inmunogenicidad se pueden unir con
55 macromoléculas inmunogénicas tales como albúmina para la inmunización.

De manera alternativa, se pueden utilizar anticuerpos recombinantes, los cuales se producen utilizando una técnica de recombinación genética que implica: la clonación de genes de anticuerpo de los hibridomas; incorporando los
60 genes de anticuerpo en vectores apropiados; y la introducción de vectores en huéspedes (véase, por ejemplo, Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Específicamente, los ADNc de la región variable de anticuerpo (región V) se sintetiza a partir del ARNm de hibridomas utilizando una transcriptasa inversa. Tras la obtención de los ADN que codifican las regiones V de anticuerpo de interés, los ADN se ligan con ADN que codifican las regiones
65 constantes de anticuerpo (regiones C) deseadas. Los productos de unión resultantes se incorporan entonces en vectores de expresión. De manera alternativa, los ADN que codifican la región V de anticuerpo se pueden incorporar

en vectores de expresión que contienen los ADN de la región C de anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión de manera que se expresen bajo el control de las regiones de control de la expresión, por ejemplo, un amplificador y un promotor. Después, se pueden transformar las células huésped con los vectores de expresión resultantes y se permite que expresen los anticuerpos.

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, conejo, y pollo), anticuerpos monoclonales quiméricos, y similares. El anticuerpo monoclonal se puede preparar por el cultivo de hibridomas que se obtienen por la fusión entre las células esplénicas de animales no humanos (por ejemplo, ratones o ratones productores de anticuerpos humanos, pollos y conejos) inmunizados con proteínas CAPRIN-1 y células de mieloma. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo preparado a partir de una combinación de secuencias derivadas de diferentes animales es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico se puede preparar por un método conocido por la técnica que implica, por ejemplo, ligar los ADN que codifican las regiones V de anticuerpo con los ADN que codifican las regiones C de anticuerpo humano; incorporar los productos de unión resultantes en vectores de expresión; e introducir los vectores en los huéspedes de manera que se produzcan los anticuerpos. En los Ejemplos que se describen posteriormente, el anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón se preparó y se confirmó el efecto antitumoral del mismo. Estos anticuerpos monoclonales comprenden una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, en los que la región VH comprende una CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y una CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y la región VL comprende una CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, una CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y una CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

El anticuerpo humanizado, también llamado anticuerpo humano remodelado, es un anticuerpo modificado. El anticuerpo humanizado se construye injertando regiones determinantes de complementariedad de anticuerpo humano con CDR de anticuerpos derivados de un animal inmunizado. Para esto se conoce también una estrategia general de recombinación genética.

Específicamente, por ejemplo, se sintetizan por PCR las secuencias de ADN diseñadas para unir CDR de anticuerpos de ratón y de pollo y regiones marco conservadas (FR) de anticuerpos humanos utilizando varios oligonucleótidos preparados que tiene partes terminales que se solapan entre ellas. Los ADN obtenidos se ligan con ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos resultantes de la unión se incorporan en los vectores de expresión, que entonces se introducen en los huéspedes para la producción de anticuerpos para obtener el anticuerpo de interés (véase, la Publicación de Solicitud de Patente Europea N° EP239400 y la Publicación Internacional N° WO96/02576). Las FR del anticuerpo humano conectadas por medio de las CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio favorable de unión al antígeno. Si fuera necesario, los aminoácidos de las regiones marco conservadas de las regiones variables de anticuerpo se pueden sustituir de manera que las CDR del anticuerpo humano remodelado resultante formen un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Además, estas regiones marco conservadas se pueden sustituir por regiones marco conservadas de distintos anticuerpos humanos (véase la Publicación Internacional N° WO99/51743).

Las regiones marco conservadas de anticuerpo humanas conectadas por medio de las CDR se seleccionan de manera que las CDR formen un sitio favorable de unión al antígeno. Si fuera necesario, los aminoácidos de las regiones marco conservadas de las regiones variables de anticuerpo se pueden sustituir de manera que las CDR del anticuerpo humano remodelado resultante forme un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856).

Los aminoácidos de las regiones variables (por ejemplo, las FR) o las regiones constantes del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado así preparado se pueden sustituir por otros aminoácidos.

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

Ejemplos de anticuerpos modificados pueden incluir anticuerpos unidos con varias moléculas tales como polietilenglicol (PEG). En el anticuerpo modificado de la presente invención, la sustancia a la que se une no está limitada. Con el fin de obtener dicho anticuerpo modificado, el anticuerpo que se obtiene se puede modificar químicamente. Un método para esto ya se ha establecido en la técnica.

En este contexto, la frase “funcionalmente equivalente” significa que un anticuerpo al que se refiere tiene una actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente el anticuerpo a que se refiere tiene la función de dañar un tumor y esencialmente no produce rechazo cuando se aplica en seres humanos. Ejemplos de dicha actividad puede incluir la actividad anti-proliferativa y la actividad de unión.

Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a cierto polipéptido, que implica la introducción de una mutación en un polipéptido, se conoce bien por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden introducir apropiadamente una mutación en el anticuerpo de la presente invención utilizando la mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. et al., (1995) *Gene* 152: 271-275; Zoller, MJ., y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.*, 100: 468-500; Kramer, W. et al., (1984) *Nucleic Acids Res.*, 12: 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, HJ., (1987) *Methods Enzymol.*, 154: 350-367; Kunkel, TA., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82: 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.*, 85: 2763-2766) o similares, preparando de esta manera un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRIN-1 reconocida por cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se ha descrito anteriormente se puede obtener por un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede obtener por un método que implique la determinación del epítipo de la proteína CAPRIN-1 que es reconocido por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 por un método convencional (por ejemplo, por mapeo de epítipo) y preparar un anticuerpo utilizando un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo como inmunógeno, o un método que implique la determinación de un epítipo para un anticuerpo preparado por un método convencional y seleccionando el anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que el anticuerpo anti-CAPRIN-1. En este contexto, “epítipo” se refiere a un fragmento de anticuerpo que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, preferentemente 8 a 11 aminoácidos.

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

El anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con un agente antitumoral. La conjugación del anticuerpo con el agente antitumoral se puede llevar a cabo por medio de un espaciador que tenga un grupo reactivo (por ejemplo, un grupo succinimidilo, un grupo formilo, un grupo 2-piridilditio, un grupo maleimidilo, un grupo alcóxicarbonilo, o un grupo hidroxilo) con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo tiol, o similares.

Ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales que son conocidos públicamente en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfan, improfosulfan, piposulfan, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, alretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolmelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiostatina, clorambucilo, clonafazina, chlofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolinico, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminovulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinim, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbina, razoxano, rizoxina, esquizofilan, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecan, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilmitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los mismos.

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede administrar con un agente antitumoral para producir un efecto terapéutico mayor. Esta estrategia se es adaptable a una paciente con un cáncer que expresa CAPRIN-1 sea antes o después de la operación quirúrgica. Esta estrategia se puede aplicar, particularmente tras la cirugía, a un cáncer que expresa CAPRIN-1, que se ha tratado convencionalmente con un agente antitumoral solo, para producir una prevención mayor de la recurrencia del cáncer o la prolongación del tiempo de supervivencia.

Ejemplos del agente antitumoral que se utiliza en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incluye los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfan, improsulfan, piposulfan, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolmelamina, bullacina, bullatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatrina, clorambucilo, clornafazina, chlofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, hidrocloreto de óxido de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinoquina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano, y testolactona), aminoglutetimidina, mitotano, trilostano, ácido frolinico, aceglatona, glicósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinium, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, loxoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbina, razoxano, rizoxina, esquizofilan, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecan, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sales farmacéuticamente aceptables (conocidas en la técnica) y derivados de los mismos (conocidos en la técnica). De estos agentes tumorales se utilizan preferentemente en particular la ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel, o vinorelbina.

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede unir a un radioisótopo conocido públicamente en las bibliografías, etc., tales como ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{175}Lu , o ^{176}Lu . Deseablemente, se utiliza un radioisótopo eficaz para el tratamiento o diagnóstico del tumor.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene una reactividad inmunológica con la CAPRIN-1, un anticuerpo que reconoce específicamente la CAPRIN-1, o un anticuerpo que se une específicamente a la CAPRIN-1 y presenta actividad citotóxica o un efecto anti-proliferativo sobre el cáncer. El anticuerpo debería tener preferentemente una estructura que produzca poco o ningún rechazo en los animales receptores. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos humanos-de ratón), anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos biespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos (1) tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano, (2) tiene regiones variables con CDR (CDR1, CDR2, y CDR3) de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo de un animal no humano y regiones marco conservadas de un anticuerpo humano, o (3) estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera de un anticuerpo de un animal no humano y regiones constantes de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo de la presente invención es preferentemente de los dos primeros anticuerpos.

Dichos anticuerpos recombinantes se pueden preparar de la siguiente manera: los ADN que codifican los anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de seres humanos, de ratón, rata, conejo y pollo) contra la CAPRIN-1 humana se clonan a partir de células productoras de anticuerpos tales como los hibridomas y se utilizan como matrices en la RT-PCR o similares para preparar los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de los anticuerpos. Las secuencias respectivas de las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas y las respectivas secuencias de CDR1, CDR2, y CDR3 en cada región se determinan basándose en el sistema de numeración de Kabat EU (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Dicho ADN que codifica cada región variable o un ADN que codifica dichas CDR se prepara utilizando una técnica de recombinación genética (Sambrook et al., Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. En este contexto, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar inmunizando animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones)

con la CAPRIN-1 humana y luego se fusionan las células esplénicas extirpadas de los animales inmunizados con células de mieloma. Paralelamente a esto, se preparan los ADN que codifican las regiones variables y constantes de cadenas ligeras y/o pesadas derivadas de anticuerpos humanos, si fuera necesario, utilizando una técnica de recombinación genética o un sintetizador de ADN.

5 Para el anticuerpo humanizado, los ADN en los que se han sustituido las secuencias que codifican las CDR en los ADN que codifican regiones variables de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano por las correspondientes secuencias codificantes de CDR derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, o pollo) se pueden preparar y unir con los ADN que codifican las regiones constantes de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano para preparar un ADN que codifica el anticuerpo humanizado.

15 Para el anticuerpo quimérico, los ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo o pollo) se pueden unir con los ADN que codifican regiones constantes de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano para preparar un ADN que codifica el anticuerpo quimérico.

20 El anticuerpo de cadena sencilla se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera unidas linealmente entre ellas por medio de un enlazador. Un ADN que codifica el anticuerpo de cadena sencilla se puede preparar uniendo un ADN que codifica la región variable de cadena pesada, un ADN que codifica el enlazador, y un ADN que codifica la región variable de cadena ligera. En este contexto, las regiones variables de cadena pesada o ligera se derivan ambas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que tiene solo las CDR sustituidas por CDR derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consiste en 12 a 19 aminoácidos. Ejemplos del mismo incluyen el (G₄S)₃ que consiste en 15 aminoácidos (G.B. Kim et al., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

30 El anticuerpo biespecífico (diacuerpo) se refiere a un anticuerpo que es capaz de unirse específicamente a dos epítomos diferentes. Un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico se puede preparar ligando, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada A, un ADN que codifica una región variable de cadena ligera B, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada B, y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera A en este orden (siempre que el ADN que codifica una región variable de cadena ligera B y el ADN que codifica una región variable de cadena pesada B estén unidos por medio de un ADN que codifica un enlazador como se ha descrito anteriormente). En este contexto, las regiones variables de cadena pesada y ligera se derivan de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que tiene solo las CDR sustituidas por CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, un ratón, rata, conejo, o pollo).

40 Los ADN recombinantes que se preparan de esta manera se pueden incorporar en uno o más vectores apropiados, que se introducen entonces en células huésped (por ejemplo, células de mamífero, células de levadura, y células de insecto) de manera que los ADN se (co)expresan para producir los anticuerpos recombinantes (P.J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, P. Shepherd y C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; y J.W. Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS).

45 Ejemplos del anticuerpo de la presente invención que se prepara por cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluyen el siguiente anticuerpo (a) que se obtiene en los Ejemplos descritos posteriormente:

50 (a) es un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10 y 11 (por ejemplo, un anticuerpo compuesto de una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12).

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

Ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo de cadena sencilla, o el anticuerpo biespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos:

- 60 (i) un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 7, y 8 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10, y 11 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano;
- 65 (ii) un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende la región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, y 7 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco

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

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

Las secuencias de las regiones constante y variable de cadenas pesada y ligera de un anticuerpo humano están disponibles en, por ejemplo, NCBI (USA; GenBank, UniGene, etc.). Por ejemplo, se puede hacer referencia a las siguientes secuencias como: N° de acceso J00228 para una región constante de una cadena pesada de IgG1 humana; N° de acceso J00230 para una región constante de una cadena pesada de IgG2 humana; N° de acceso X03604 para una región constante de una cadena pesada de IgG3 humana; N° de acceso K01316 para una región constante de cadena pesada de IgG4 humana; N° de acceso V00557, X64135, y X64133 para una región constante de una cadena ligera κ humana; y N° de acceso X64132 y X64134 para una región constante de cadena ligera λ humana.

Preferentemente, estos anticuerpos tienen actividad citotóxica y por lo tanto pueden ejercer un efecto antitumoral.

Las secuencias anteriores particulares de las regiones variables y CDR de las cadenas pesada y ligera de cada anticuerpo se proporcionan simplemente con fines ilustrativos. Es obvio que el anticuerpo de la presente invención no se limita por secuencias particulares. Se preparan hibridomas capaces de producir anticuerpos humanos anti-CAPRIN-1 humana o anticuerpos de un animal no humano (por ejemplo, anticuerpos de ratón) diferentes de los que se han descrito anteriormente, y se recuperan los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas y se evalúan si son (o no) los anticuerpos de interés con actividad inmunológica de unión contra la CAPRIN-1 humana y la actividad citotóxica como índices. Los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal de interés se identifican de esta manera. Después, los ADN que codifican las regiones variables de cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de interés se producen a partir de los hibridomas y se secuencian, como se ha descrito anteriormente. Los ADN se utilizan para la preparación de diferentes anticuerpos.

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

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

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

Ejemplos adicionales del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluye un ADN que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 14. Para estos ADN, se prefiere que una región que codifica cada región constante en las cadenas pesada y ligera debiera comprender una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente derivada de un anticuerpo humano.

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

El efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se utiliza en la presente invención sobre las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 parece que se consigue mediante el siguiente mecanismo:

Parece que se produce citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) mediada por células efectoras y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra las células que expresan CAPRIN-1.

Se sabe que el efecto antitumoral basado en el mecanismo se correlaciona con el número de moléculas diana unidas al anticuerpo que se expresan en la superficie de células cancerosas (Niwa R., Clinical Cancer Research 2005 Mar 15; 11 (6): 2327-2336). El número de moléculas diana que se expresan en la superficie de las células cancerosas se puede examinar utilizando un kit de ensayo existente capaz de medir el número de moléculas en la superficie celular. Específicamente, el número de moléculas diana unidas al anticuerpo se puede determinar: haciendo reaccionar las células cancerosas con, por ejemplo, anticuerpos contra las moléculas diana como anticuerpos primarios; haciendo reaccionar con esto, anticuerpos marcados fluorescentemente contra los anticuerpos primarios, junto con una curva de calibración con perlas que se compone con el número conocido preliminarmente de moléculas; midiendo la intensidad de fluorescencia de las muestras; y determinando el número de moléculas diana basándose en la curva de calibración obtenida.

Por lo tanto, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se utiliza en la presente invención puede evaluarse en cuanto a su actividad determinando la actividad de ADCC o la actividad CDC *ex vivo* contra las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 o examinando el número de moléculas CAPRIN-1 que se expresan en la superficie de las células cancerosas en el caso de utilizar el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención como un anticuerpo primario y que se muestra específicamente posteriormente en los Ejemplos.

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

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 con una afinidad de unión más alta por una proteína CAPRIN-1 en la superficie de la célula cancerosa ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por lo tanto, se puede esperar un efecto antitumoral más fuerte si se puede obtener un anticuerpo anti-CAPRIN-1 que tenga una alta afinidad de unión por la proteína CAPRIN-1. Dicho anticuerpo se puede adaptar a una composición farmacéutica con la intención de tratamiento y/o prevención del cáncer. Deseablemente, dicha alta afinidad de unión es preferentemente al menos de 10^7 M^{-1} , al menos 10^8 M^{-1} , al menos $5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^9 M^{-1} , al menos $5 \times 10^9 \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{10} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{11} M^{-1} , al menos $5 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$, al menos 10^{12} M^{-1} , o al menos 10^{13} M^{-1} , en términos de una constante de asociación (constante de afinidad) K_a (k_{on}/k_{off}), como se ha descrito anteriormente.

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

<Unión a las células que expresan el antígeno>

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

<Tinción inmunohistoquímica>

El anticuerpo que reconoce la CAPRIN-1 se puede ensayar en cuanto a su reactividad con la CAPRIN-1 por un método inmunohistoquímico bien conocido por los expertos en la técnica utilizando una sección congelada fijada con

paraformaldehído o acetona o una sección embebida en parafina fijada con paraformaldehído de un tejido que se obtiene a partir de un paciente durante la operación quirúrgica o a partir de un animal que alberga un xenoinjerto inoculado con una línea celular que expresa CAPRIN-1 bien espontáneamente o tras la transfección.

- 5 Para la tinción inmunohistoquímica, el anticuerpo reactivo con CAPRIN-1 se puede teñir por varios métodos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede visualizar mediante la reacción con un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano rústico, un anticuerpo de cabra anti-conejo o un anticuerpo de cabra anti-pollo.

<Composición farmacéutica>

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

- 15 Los términos "tumor" y "cáncer" que se utilizan en el presente documento significan una neoplasia maligna y se utilizan de manera intercambiable entre ellos.

- 20 El cáncer dirigido en la presente invención es un cáncer que expresa un gen que codifica la proteína CAPRIN-1 y preferentemente es un cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

- 25 Ejemplos específicos de estos cánceres incluyen, pero no se limitan a, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama tipo complejo, tumor mixto maligno de glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas, cáncer de células grandes, glioma que es un tumor de tejido neuroepitelial, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de tipo celular pequeño y medio, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transversal, cáncer de colon sigmoideo, cáncer rectal, cáncer ovárico epitelial, tumor de células germinales, tumor de células del estroma, carcinoma pancreático ductal, carcinoma pancreático ductal invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma celular acinar, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia mucinoso papilar intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, cistadenocarcinoma seroso, tumor seudopapilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple tipo-1 (síndrome de Wermer), tumor celular de islotes no funcional, somatostatinooma, y VIPoma.

- 35 El sujeto de ensayo como receptor es preferentemente un mamífero, por ejemplo, mamíferos que incluyen primates, mascotas, animales de granja, y animales deportivos y particularmente son preferentemente seres humanos, perros y gatos.

- 40 En el caso del uso del anticuerpo de la presente invención como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica se puede formular por un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede utilizar en forma de inyección parenteral de una solución o suspensión aséptica con agua u otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica se puede formular con el anticuerpo mezclado en una forma de dosificación unitaria necesaria para la práctica farmacéutica aceptada en general, en una combinación apropiada con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, un emulsionante, un agente suspensor, un detergente, un estabilizante, un agente saborizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, etc. La cantidad del principio activo de dicha preparación se determina de manera que se consiga una dosis apropiada en el intervalo prescrito.

- 50 Una composición aséptica para inyección se puede formular de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional utilizando un vehículo tal como agua destilada inyectable.

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

- 60 Ejemplos de soluciones oleosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones se pueden utilizar en combinación con un solubilizante tal como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Las soluciones se pueden mezclar adicionalmente con un tampón (por ejemplo, una solución tampón fosfato y una solución tampón de acetato sódico), un agente de inyección (por ejemplo, hidrócloruro de procaina), un estabilizante (por ejemplo alcohol bencílico o fenol), y un antioxidante. Las soluciones inyectables preparadas de esta manera se cargan habitualmente en ampollas apropiadas.

65

La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral o parenteral, preferentemente parenteral. Ejemplos específicos de sus formas de dosificación incluye inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar, y agentes de administración percutánea. Ejemplos de las inyecciones incluyen la inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea, mediante las cuales se puede administrar la composición farmacéutica sistémica o localmente.

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

La composición farmacéutica que incluye el anticuerpo o fragmentos del mismo de la presente invención se puede administrar a un sujeto para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente el cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

La presente invención engloba adicionalmente medios de tratamiento y/o prevención del cáncer, por la administración de la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral que se ha ejemplificado anteriormente o una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral a un sujeto. El anticuerpo o el fragmento del mismo de la presente invención pueden administrarse simultáneamente con o separadamente del agente antitumoral al sujeto. En el caso de la administración por separado de estas composiciones farmacéuticas, cualquiera se puede administrar antes o después. Sus intervalos, dosis, vías de administración y el número de dosis pueden ser seleccionados por un especialista. Las formas de dosificación de fármacos distintos que se van a administrar simultáneamente también incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas que se formulan cada una mezclando el anticuerpo o el fragmento del mismo de la presente invención y el agente antitumoral en un vehículo (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores sobre la prescripción, formulación, vías de administración, dosis, cáncer, etc. como las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen el anticuerpo de la presente invención también se aplican a cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente y las formas de dosificación que contienen el agente antitumoral.

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

<Polipéptido y ADN>

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

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

Estos polipéptidos y ADN se pueden preparar utilizando técnicas de recombinación genética como se ha descrito anteriormente.

De aquí en adelante, la presente invención se describirá específicamente en referencia a los Ejemplos. Sin embargo, el alcance de la presente invención no tiene la intención de estar limitado por estos ejemplos específicos.

Ejemplo 1 Análisis de la expresión genética de CAPRIN-1 en cada tejido

Se examinó la expresión genética de CAPRIN-1 en tejidos normales caninos y humanos y varias líneas celulares por RT-PCR de acuerdo con el Ejemplo 1 (4) descrito en el documento WO2010/016526. Como resultado, se observaba una fuerte expresión en el testículo entre los tejidos caninos sanos, mientras que se observó expresión en cáncer de mama canino, y tejidos de adenocarcinoma. Como resultado de la confirmación de la expresión también en tejidos

humanos, se confirmó la expresión solo en los testículos entre los tejidos normales, como con el gen de CAPRIN-1 canino. Por el contrario, se detectó la expresión en muchos tipos de líneas celulares cancerosas, incluyendo 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1) y 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Pane-1, y BxPc-3), entre las células cancerosas. Estos resultados demostraban que la CAPRIN-1 se expresa en varias células cancerosas, aunque su expresión no se ve en tejidos normales distintos de los testículos.

Ejemplo 2. Preparación del anticuerpo monoclonal de ratón contra CAPRIN-1

Se mezclaron 100 µg de proteínas CAPRIN-1 humanas que tenían la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que se prepararon como en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526, con una cantidad igual de adyuvante MPL+TDM (Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se utilizó como solución antigénica por ratón. La solución antigénica se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (Japan SLC, Inc.). Después se llevaron a cabo 7 refuerzos cada semana para completar la inmunización. Tres días después de la última inyección, se extirpó el bazo de cada ratón y se trituró entre dos portaobjetos de cristal estériles. Se repitieron tres veces los procedimientos de lavado con PBS (-) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y retirada del sobrenadante por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos para obtener las células esplénicas. Las células esplénicas obtenidas se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (obtenidas en la ATCC) con una relación de 10:1. Se calentaron 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS a 37 °C y se mezclaron con 800 µl de PEG 1500 (Boehringer Ingelheim GmbH), y la solución de PEG preparada de esta manera se añadió a la mezcla de células, en entonces se dejó en reposo durante 5 minutos para la fusión celular. Tras la retirada del sobrenadante por centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, se suspendieron las células en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía un 15 % de FBS suplementado con un 2 % de equivalente de una solución HAT (Life Technologies, Inc. /Gibco) (medio HAT selectivo). Esta suspensión se inoculó en quince placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc. /Nunc) a una concentración de 10 µl/pocillo. Las células esplénicas y las células de mieloma se fusionaron por cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones de un 5 % de CO₂ para obtener los hibridomas.

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

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana más tarde, se observaban hibridomas que formaban colonias sencillas. Las células en estos pocillos se cultivaron adicionalmente, y los hibridomas clonados se exploraron con respecto a la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1 como índice. Se añadió una solución de un µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de BSA al 0,5 % a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. Se desechó la solución de cada pocillo, y se lavó tres veces cada pocillo con 400 µl de PBS-T. Luego, se añadió el sobrenadante de cada hibridoma que se obtuvo anteriormente a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadieron anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón marcados con HRP (Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadió una solución sustrato TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 112 líneas de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales reactivos con CAPRIN-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales se exploraron en cuanto a anticuerpos reactivos con la superficie de células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron 10⁶ células de la línea celular MDA-MB-231V de cáncer de mama humano en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl

del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras lavar con PBS, se añadieron anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con FITC (Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se llevó a cabo la misma operación anterior utilizando el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad sin tratar diluido 500 veces con un medio para cultivo de hibridomas, en vez de los anticuerpos, para preparar un control. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal (nº 1) que tenía una intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control, es decir, era reactivo con la superficie de las células de cáncer de mama.

10 Ejemplo 3. Caracterización del anticuerpo monoclonal seleccionado

Los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 2 se analizaron de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526 en cuanto a sus secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos codificados por estas. El anticuerpo monoclonal nº 1 resultante estaba compuesto por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal nº 1 se muestra en la SEQ ID NO: 13, y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de la misma se muestra en SEQ ID NO: 14, y la secuencia de aminoácidos se muestra en SEQ ID NO: 12.

Específicamente, se confirmó que el anticuerpo monoclonal nº 1 estaba compuesto por la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 12, en el que la región variable de cadena pesada tiene una CDR1, CDR2 y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, 6, y 7, respectivamente, y la región variable de cadena ligera tenía una CDR1, CDR2, y CDR3 que consistían en las secuencias de aminoácido de SEQ ID NO: 9, 10, y 11, respectivamente.

Ejemplo 4 Preparación del anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón

Ambos extremos del fragmento de la amplificación genética que comprendía el nucleótido que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal nº 1 de ratón que se obtuvo en el Ejemplo 3, que está representada por SEQ ID NO: 13, se trató con enzimas de restricción, a continuación se purificó y se insertó de acuerdo con un método de rutina en un vector pcDNA4/myc-His (Invitrogen Corp.) que ya tenía inserciones genéticas de una secuencia líder derivada de un anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG1 humana que comprende SEQ ID NO: 37. También se trató el fragmento de amplificación genética que comprende el gen de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal nº 1 de ratón en ambos extremos con enzimas de restricción, a continuación se purificó, y se insertó de acuerdo con un método de rutina en un vector pcDNA3.1/myc-His que ya tenía inserciones de una secuencia líder derivada de un anticuerpo de ratón y una región constante de cadena L de IgG1 humana que comprende SEQ ID NO: 38.

A continuación, el vector recombinante que tiene la inserción de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 13) del anticuerpo monoclonal nº 1 de ratón y el vector recombinante que tenía la inserción de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 14) del anticuerpo monoclonal nº 1 de ratón se introdujeron en células CHO-K1 (obtenidas en Riken Cell Bank). Específicamente, se cultivaron 2×10^5 células de CHO-K1 en un medio F12 de Ham (Invitrogen Corp.) que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos, y se lavaron con PBS (-). Después, se añadió un medio F12 de Ham reciente que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores lisados en 30 µl de OptiMEM (Invitrogen Corp.) con 30 µl de reactivo de transfección Polyfect (Qiagen N.V.), y se añadió la mezcla a cada pocillo. Las células CHO-K1 co-transfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 % suplementado con 200 µg/ml de Zeocin (Invitrogen Corp.) y 200 µg/ml de Geneticin (Roche Diagnostics K.K.) y entonces se inocularon en una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo para preparar una línea celular que producía establemente un anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón nº 1 (nº 1) que tenía las regiones variables del anticuerpo monoclonal de ratón nº 1.

Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm² a una densidad de 5×10^5 células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO libre de suero (Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de los cultivos que contenían el anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón nº 1.

También, se prepararon las líneas celulares que producían establemente los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón de comparación 1 a 11 de la misma manera que anteriormente utilizando los siguientes anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-1 derivados del ratón que se describen en el documento WO2010/016526 como anticuerpos de comparación: un anticuerpo de comparación 1 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 16; un anticuerpo de comparación 2 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 18; un anticuerpo de comparación 3 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 19 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 20; un anticuerpo comparativo 4 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 22; un anticuerpo

comparativo 5 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 24; un anticuerpo comparativo 6 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 26; un anticuerpo comparativo 7 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 27 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 28; un anticuerpo comparativo 8 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 30; un anticuerpo comparativo 9 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 31 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 32; un anticuerpo comparativo 10 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 33 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 34; y un anticuerpo comparativo 11 que consistía en la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 35 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 36. Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm² con una densidad de 5 x 10⁵ células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO libre de suero (Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de cultivos que contenían cualquiera de los anticuerpos quiméricos humano-de ratón 1 a 11 de comparación.

Ejemplo 5 Expresión de CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas utilizando un anticuerpo anti-CAPRIN-1 n° 1

A continuación, se examinaron las líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1), las líneas de células cancerosas de riñón (Caki-1, Caki-2, A498, y ACHN), línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), línea de células de cáncer de ovario (SKOV3), líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2 y MIAPaCa-2), línea celular de cáncer de próstata (PC3), línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), línea celular de fibrosarcoma (HT1080), líneas celulares de tumor cerebral (T98G, U87MG, U251, SNB19, y U373), líneas celulares de cáncer gástrico (MNK28 y MNK45), líneas celulares de cáncer de intestino grueso (HT29, Lovo, CaCo2, SW480, y HCT116), línea celular de leucemia (AML5), y la línea celular de linfoma (Ramos) en las que se confirmó que tenían expresión genética de CAPRIN-1 en cuanto a la expresión de proteínas CAPRIN-1 sobre la membrana celular utilizando los sobrenadantes de cultivos que contenían el n° 1 que se obtuvo en el Ejemplo 4. Se centrifugaron 5 x 10⁵ células de cada línea celular en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Cada sobrenadante del cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo n° 1 se añadió al tubo y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se añadieron anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) de ratón marcados con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos en PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo que se utilizó fueron las células que se hicieron reaccionar solo con los anticuerpos secundarios. Como resultado, las células suplementadas con el anticuerpo n° 1 tenían una intensidad de fluorescencia al menos un 35 % más fuerte que el control negativo. Esto demostraba que las proteínas CAPRIN-1 se expresaban sobre la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. La tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia anterior se indicaba por la tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) de cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia media (Tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia) (\%)} = ((\text{MFI de las células que reaccionan con los anticuerpos anti-CAPRIN-1}) - (\text{MFI del control})) / (\text{MFI del control}) \times 100$$

Ejemplo 6: Efecto antitumoral (actividad ADCC) del anticuerpo anti-CAPRIN-1 sobre la célula cancerosa

Se estudió el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 quimérico humano-de ratón n° 1 que se obtuvo en el Ejemplo 4, en cuanto a su capacidad para dañar las células cancerosas que expresaban CAPRIN-1 por el ensayo de actividad ADCC. El sobrenadante del cultivo de células que producían n° 1 se purificó utilizando Hitrap Proteína A Sepharose FF (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Tras la sustitución con PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se utilizó para el ensayo de actividad. Se recolectaron 10⁶ células de cada una de la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, línea celular de cáncer de intestino grueso humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2, y línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, en las que se había confirmado que tenía expresión de CAPRIN-1, en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que entonces se añadió 100 µCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, se lavaron las células tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS y se añadieron a una densidad de 2 x 10³ células/pocillo en cada placa de 96 pocillos con fondo en V para preparar las células diana. Se añadió el anticuerpo n° 1 purificado y los anticuerpos quiméricos humano-de ratón de comparación 1 a 11 obtenidos en el Ejemplo 4 a una concentración de 1 µg/pocillo. Se añadió una población celular que contenía células NK humanas separadas de entre los linfocitos de sangre periférica humana utilizando un método de rutina a cada placa a una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO₂. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberado de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 contra las células cancerosas. El control negativo que se utilizó era de las células suplementadas con anticuerpos de isotipo de control. La población que contenía las células NK que se utilizaron en esta evaluación se prepararon de la siguiente manera: las células mononucleares de sangre periférica humanas de la sangre periférica humana que se separaron de acuerdo con

un método de rutina que utilizaba una solución Histopaque de separación por gravedad específica para la separación de células mononucleares de sangre periférica humana (Sigma-Aldrich Corp.) se hicieron reaccionar con varios anticuerpos marcados con FITC (anticuerpo anti-CD3 humano, anticuerpo anti-CD20 humano, anticuerpo anti-CD19 humano, anticuerpo anti-CD11c humano, y anticuerpo anti-HLA-DR (Becton and Dickinson and Company)), y se separó una población celular sin teñir con los anticuerpo utilizando un clasificador celular (FACS Vantage SE (Becton and Dickinson and Company)) o un kit de separación de células NK humanas (Miltenyi Biotec K.K.). Como resultado de la evaluación de la actividad citotóxica contra las células cancerosas, los anticuerpos de isotipo de control que se utilizaron y los anticuerpos comparativos 1 a 11 que se utilizaron tenían una actividad citotóxica menor del 5 % contra cada línea celular. Por el contrario, el anticuerpo nº 1 presentaba una actividad citotóxica del 20 %, 17 %, 27 % y 10 % contra la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, respectivamente. Al igual, los anticuerpos de isotipo de control que se utilizaron y los anticuerpos comparativos 1 a 11 que se utilizaron tenían una actividad citotóxica menor del 4 % contra el resto de células cancerosas, líneas celulares de cáncer de mama ZR75-1, T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1, líneas celulares de glioma T98G y U373, una línea celular de cáncer de pulmón A549, líneas celulares de cáncer de riñón Caki-1 y ACHN, una línea celular de cáncer de cuello uterino SW756, una línea celular de cáncer de vejiga urinaria T24, líneas celulares de cáncer gástrico MKN28 y MKN45, una línea celular de cáncer de intestino grueso SW480, una línea celular de leucemia AML5, y la línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, se confirmó que el anticuerpo nº 1 tenía una actividad citotóxica del 10 % o mayor contra estas líneas celulares. Estos resultados demostraban que el anticuerpo monoclonal nº 1 que se obtiene contra CAPRIN-1 daña las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 mediante su actividad ADCC, y demostraron que el anticuerpo nº 1 presenta una actividad citotóxica más fuerte contra células de cáncer humano que la de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Estos resultados acerca de la actividad citotóxica se obtuvieron mezclando el anticuerpo contra CAPRIN-1 de la presente invención, células linfocitarias (población que contenía células NK), y 2×10^3 células de cada línea celular cancerosa con cromo 51 incorporado, como se ha descrito anteriormente, cultivando a continuación las células durante 4 horas, midiendo tras el cultivo, la cantidad de cromo 51 liberado en el medio, y calculando la actividad citotóxica contra cada línea celular cancerosa de acuerdo con la siguiente expresión.

Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con el anticuerpo contra CAPRIN-1 y células linfocíticas (población que contiene células NK) / Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100

Ejemplo 7. Efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 en el ratón *in vivo*

A continuación, se evaluó el anticuerpo monoclonal humano-de ratón nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 4 en cuanto a su efecto antitumoral sobre los ratones que albergaban un cáncer *in vivo*. El anticuerpo que se utilizó se purificó en una columna a partir del sobrenadante del cultivo de cada línea celular productora del anticuerpo nº 1. De manera similar, también se evaluaron los anticuerpos anti-CAPRIN-1 monoclonales quiméricos humanos-de ratón de comparación 1 a 11 que se prepararon en el Ejemplo 4 en cuanto a sus efectos antitumorales sobre ratones que albergaban cáncer *in vivo*.

Se estudió el anticuerpo nº 1 en cuanto a su efecto antitumoral utilizando ratones que albergaban cánceres en los que se había trasplantado una línea celular cancerosa derivada de cánceres humanos que expresan CAPRIN-1. Se trasplantaron por vía subcutánea 2×10^5 células por ratón de la línea celular Capan-2 de cáncer pancreático humano (obtenido en la ATCC) en el lomo de 65 ratones Balb/c desnudos (Japan SLC, Inc.) y se dejaron crecer hasta que el tamaño del tumor alcanzaba aproximadamente 5 mm de diámetro. El anticuerpo nº 1 y los anticuerpos quiméricos humanos-de ratón de comparación 1 a 11 se administraron por vía intraperitoneal a una dosis de 200 µg (200 µl)/ratón a 5 (por anticuerpo) de estos ratones que albergaban cáncer. Después, se administró por vía intraperitoneal cada anticuerpo a los ratones que albergaban cánceres a la misma dosis que anteriormente un total de tres veces durante 2 días. El tamaño del tumor se midió cada día, y se observó el efecto antitumoral. Por otro lado, se administró PBS (-) en vez de los anticuerpos a los restantes 5 ratones que albergaban cáncer, que a su vez se utilizaron como grupo de control. El tamaño del tumor se calculó en términos de volumen de acuerdo con la expresión $0,5 \times (\text{eje mayor} \times \text{eje menor} \times \text{eje menor})$.

Como resultado de la observación del efecto antitumoral, en el grupo de ensayo que recibieron el anticuerpo nº 1 contra CAPRIN-1, la proliferación tumoral se redujo hasta el 70 % el día 29 tras la administración del anticuerpo (con el tamaño tumoral del grupo de control el mismo día definido como el 100 %). Por el contrario, en los ratones que recibieron los anticuerpos quiméricos humanos-de ratón de comparación 1 a 11 la proliferación tumoral se redujo hasta aproximadamente el 85 %. Estos resultados demostraban que el anticuerpo nº 1 que se obtuvo contra la CAPRIN-1 ejerce un efecto antitumoral *in vivo* sobre las células cancerosas que expresan CAPRIN-1. Estos resultados demostraban también que el anticuerpo nº 1 ejerce un efecto antitumoral *in vivo* más fuerte que el de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Ejemplo 8. El número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de distintas células cancerosas es reconocido por el anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1

Las líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1), líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498, y ACHN), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), líneas celulares de cáncer pancreático (MIAPaCa-2 y Capan-2), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), líneas celulares de tumor cerebral (T98G, U87MG, U251, SNB19, y U373), líneas celulares de cáncer gástrico (MNK28 y MNK45), líneas celulares de cáncer de intestino grueso (HT29, Lovo, CaCo2, SW480, y HCT116), una línea celular de leucemia (AML5), y una línea celular de linfoma (Ramos) se examinaron utilizando un kit de ensayo QIFIKIT para el número de moléculas (Dako Japan, Inc.) en cuanto al número de moléculas de CAPRIN-1 en sus superficies celulares reconocidas por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 nº 1. De manera similar, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de estas distintas células cancerosas también se examinaron utilizando los anticuerpos 1 a 11 de comparación, que son los anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-1 preparados en el Ejemplo 4.

De acuerdo con el protocolo adjunto al kit, se diluyeron el anticuerpo nº 1 y los anticuerpos comparativos 1 a 11 en 5 µg/ml (en términos de concentración final) con PBS, y esta dilución se añadió a cada línea celular y se hicieron reaccionar durante 30 minutos. Tras lavar con PBS, se añadieron los anticuerpos anti-IgG de ratón marcados con fluorescencia adjuntos en el kit como anticuerpos secundarios, junto con perlas de calibración adjuntas al kit, a cada línea celular y se dejó en reposo durante 45 minutos en hielo. Cada línea celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. Entonces, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un FACS Calibur (Becton, Dickinson y Company) para obtener un valor (medio) de la intensidad media de fluorescencia. Además, se midieron los anticuerpos de comparación de manera similar a anteriormente para obtener una media. El control negativo que se utilizó eran células que se hacían reaccionar con anticuerpos de isotipo de control, y también se obtenía una media. Cada valor (medio) de intensidad media de fluorescencia se utilizaba para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de distintas células cancerosas que reconoce el anticuerpo nº 1 era de 10^5 o más por célula para todas las líneas celulares de cánceres humanos. Por otra parte, el número de moléculas que reconocen los anticuerpos monoclonales de comparación 1 a 11 era menor de 10^5 por célula.

Aplicabilidad industrial

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Composición farmacéutica para el tratamiento y prevención del cáncer

<130> PH-5303-PCT

<150> JP 2011-171303

<151> 04-08-2011

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5562

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(2319)

<223>

<400> 1

ES 2 618 026 T3

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgtcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgcca cggagcgcgc gacactgcc	120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgccactcg tgatttcag cggcctccgc	180
gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg	231
Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser	
1 5 10	
tcc gga cag cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg	279
Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
15 20 25 30	
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
35 40 45	
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
50 55 60	
aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	

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

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

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

gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609
 ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc ctcccttag atgcataggg 3669
 agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729
 ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789
 tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatccacact ttaagcaaag gctactaagt 3849
 taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattcct 3909
 ccagtaggtg ctgagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969
 tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctgttgaac attccacatt 4029
 caaaagtttt gtaggggtgt gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089
 aaaataagtt ctgactttt ctcatgtgtg gttgtgtgtac atcatatttg aagggttaac 4149
 ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgogtg cttaaataga 4209
 catctgcctg ggatgtacca caaccatatg ttacctgtat cctaggggaa tggataaaat 4269
 atttgtggtt tactgggtaa tccttagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329
 atttgcctac tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc 4389
 ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449
 gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaagggtg tcatagtttg 4509
 actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaactat aatttttctt 4569
 tttttggtta ttttaccatc acagtttaaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629
 tattttttaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689
 ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749
 ccttttggtt ggtcaaatgc atatttttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809
 tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869
 taaatcatct catgtggata tgaaacttct tttttaaaac ttaaaaagggt agaattgtat 4929
 tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989
 aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049
 atcagtttagc ttctacagtt cttttgtctc ctttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109
 tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaagggtcat taactgaggt 5169
 gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttccctaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229
 atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289
 tcattttatg ttttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa 5349
 attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgccttggat cttgtccttt 5409
 ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469
 tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatgtt 5529
 taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

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

5

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

ES 2 618 026 T3

450		455		460	
Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala					
465		470		475	480
Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln Ala Gly					
	485		490		495
Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala Ala Pro					
	500		505		510
Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro					
	515		520		525
Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln Ala Ser					
	530		535		540
Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln Thr Glu					
545		550		555	560
Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His Gly Ser					
	565		570		575
Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro Pro Gln					
	580		585		590
Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn Ser Arg					
	595		600		605
Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met Asn Gly					
	610		615		620
Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly Tyr Arg					
625		630		635	640
Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser Gln Phe					
	645		650		655
Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr Gln Gln					
	660		665		670
Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala Pro Arg					
	675		680		685
Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln Met Asn					
	690		695		700

Thr Gln Gln Val Asn
705

<210> 3
<211> 3553
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

ES 2 618 026 T3

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

ES 2 618 026 T3

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

```

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

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

ttctgttctg gccttggaag agctgttaat agtctgcatg ttaggaatac atttatcctt 2354

tccagacttg ttgctaggga ttaaataaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttgagcc 2414

caaattttta tttttgaatg atttaatttt ccctgttact atataaactg tcttgaaaac 2474

tagaacatat tctctttctca gaaaaagtgt ttttccaact gaaaattatt tttcaggtcc 2534

taaaacctgc taaatgtttt taggaagtac ttactgaaac atttttgtaa gacatttttg 2594

gaatgagatt gaacatttat ataaatttat tattcctctt tcattttttt gaaacatgcc 2654

tattatattt tagggccaga caccctttaa tggccggata agccatagtt aacatttaga 2714

gaaccattta gaagtgatag aactaatgga atttgcaatg ccttttgagc ctctattagt 2774

gatataaata tcaagttatt tctgactttt aaacaaaact cccaaattcc taacttattg 2834

agctatactt aaaaaaaatt acaggtttag agagtttttt gtttttcttt tactgttgga 2894

aaactacttc ccattttggc aggaagttaa cctatttaac aattagagct agcatttcac 2954

gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgagggagg ttaaacaatc aacagggttc 3014

ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgtaaggag gaattacaac gtactttgat 3074

ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaataat taatggatca 3134

cttggggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta 3194

tgttctttcc cacctttag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc 3254

tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat 3314

gttatgtagt ttctttttta cagtttaggt aataaggtct gttttcattc tgggtgcttt 3374

attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga 3434

atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgctgtatct attcccaacg 3494

cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa tatttgttga atgaatgaa 3553

```

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

<400> 4

```

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

```

```

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

```

ES 2 618 026 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 618 026 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Ile Leu Trp Trp
690

<210> 5
<211> 4
5 <212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 5

Asp Ile Tyr Met
1

<210> 6
<211> 17
15 <212> PRT
<213> *Mus musculus*
<400> 6

ES 2 618 026 T3

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

Gly

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

<400> 7

Thr Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
1 5 10

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 8

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

Ala Ser Gly Leu Asn Ile Arg Asp Ile Tyr Met His Trp Val Lys Gln
20 25 30

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

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

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

Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gly Thr Gly Asp Tyr Trp
85 90 95

Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
100 105

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

<400> 9

Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr
1 5 10 15

<210> 10
<211> 7

<212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 10

5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

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

10

<400> 11

Arg Gln Ser Tyr Asn Leu Val Thr Phe
 1 5

15

<210> 12
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 12

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

Val Ser Ala Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser
 20 25 30

Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Val Gln His
 35 40 45

Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg
 50 55 60

Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Arg Gln Ser Tyr Asn Leu Val Thr Phe Gly Ala Gly Pro Ser
 100 105 110

25

<210> 13
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 13

ES 2 618 026 T3

```

ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttgt cctgcacagc ttctggcctc      60
aacattagag acatttatat gcaactgggtg aagcagagggc ctgaacaggg cctggagtgg      120
attggaaaga ttgatcctgc gaatggtaat actaaatatg acccgaagtt ccagggcaag      180
gccactataa cagcagacac atcctccaac actgcctatg tgcagctcag cagcctgaca      240
tctgaggaca ctgccgtcta ttactgtgct gggactgggtg actactgggg ccaagggacc      300
acggtcaccg tctcctca                                     318

```

<210> 14
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 14

```

ggtacctgtg gggacattgt gatgtcacag tctccatcct ccctggctgt gtcagcagga      60
gagaaggtea ctatgagctg caaatccagt cagagtctgc tcaacagtag aaccgaaag      120
aactacttgg cttgggtcca gcacaaacca gggcagtctc ctagactact aatctactgg      180
gcatccacta gggaaatctgg ggtccctgat cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat      240
ttcactctca ccatcagcag tgtgcaggct gaggacctgg cagtttatta ctgcaggcaa      300
tcttataatc tggtcacggt cgggtgctgga ccaagc                                     336

```

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

<400> 15

ES 2 618 026 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
145

```

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

<400> 16

ES 2 618 026 T3

Met	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Val	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Thr	1		5		10				15						
Gly	Ala	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser			20		25				30						
Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gly	Asn			35		40				45						
Ile	His	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro			50		55				60						
Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Asn	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser			65		70				75						80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn					85				90						95
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp					100				105					110	
Ser	Thr	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Ala					115				120					125	
Asp	Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Asn	Pro	Tyr	Asp										130				135						

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
 145

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

<400> 18

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

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

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

ES 2 618 026 T3

Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Arg Gln Pro
 50 55 60
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser Trp Val Pro
 65 70 75 80
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 85 90 95
 Ser Asn Val His Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Asn
 100 105 110
 His Gly Ser Phe Leu Pro Ser Arg Ser Glu Gln Val Pro Ser Trp Arg
 115 120 125
 Ser Asn Asn Arg
 130

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

<400> 19

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

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

Pro Ser Val Tyr
145

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

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Gln Ser Asp
115

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

<400> 21

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
145

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

<400> 22

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

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

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

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

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

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

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

5

<400> 23

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
145
    
```

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

15 <400> 24

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

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

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

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

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

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

Val Gln Val Pro Arg Arg Arg Ser Asn
100 105

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

<400> 25

Asp Ile Leu Gln Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn
1 5 10 15

Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile
20 25 30

Asn Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys
35 40 45

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

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

Gly Val Trp Ser Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
85 90 95

Val Ser Ser Lys
100

ES 2 618 026 T3

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

5

<400> 26

```

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Arg Thr Ala
1           5           10           15

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
          20           25           30

Tyr Leu Ala Ser Asn Arg Asp Thr Gly Leu Pro Asp Arg Phe Pro Gly
          35           40           45

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

Glu Asp Leu Glu Asp Tyr Phe Cys Leu Gln His Cys Asn Tyr Pro Asn
65           70           75           80

Glu Phe Arg Gly Cys Thr Lys Val Pro Ile
          85           90
  
```

10

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

15

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Asn
115

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

<400> 28

ES 2 618 026 T3

```

Thr Ser Asp Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
1           5           10           15

Ser Gln Asp Ile Asn Ser Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly
          20           25           30

Lys Ser Pro Lys Thr Leu Ile Tyr Arg Ala Asn Arg Leu Val Asp Gly
          35           40           45

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

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Tyr Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu
65           70           75           80

Gln Tyr Asp Glu Phe Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
          85           90           95

Ile Lys Gln Lys
          100

```

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

<400> 29

```

Ala Trp Leu Ser Gln Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
1           5           10           15

Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu
          20           25           30

Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro
          35           40           45

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

Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr
65           70           75           80

Tyr Cys Ala Arg Pro Ile His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Leu Ala Tyr
          85           90           95

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

```

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

5

<400> 30

```

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

Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr
          20           25           30

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

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

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

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

Val Pro Ser Trp Arg Ser Asn Lys
          100
    
```

10

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

15

<400> 31

```

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

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

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

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

ES 2 618 026 T3

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

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

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

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

<400> 32

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

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

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

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

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

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

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

<400> 33

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

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

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

Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser

50

55

60

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

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

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

<210> 34

<211> 102

<212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Trp Lys Ser Asn
100

5

10

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

5

<400> 35

```

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Lys
      100
    
```

10 <210> 36
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 36

ES 2 618 026 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Lys

<210> 37

<211> 330

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 37

ES 2 618 026 T3

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	1	5	10	15
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	20	25	30	
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	35	40	45	
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	50	55	60	
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	65	70	75	80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	85	90	95	
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	100	105	110	
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	210	215	220	
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	225	230	235	240
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	245	250	255	

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

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

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

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

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

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

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

5

10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tienen reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1, comprendiendo el anticuerpo o el fragmento del mismo una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 9, 10 y 11.
2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo multiespecífico.
3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo se conjugan con un agente antitumoral.
4. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
5. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
6. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como principio activo.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
9. Una combinación farmacéutica que comprende la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
10. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9 para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
11. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
12. Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.