

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 249**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/09** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C12P 21/08** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**C07K 16/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/JP2012/069862**  
 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018894**  
 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12820596 (0)**  
 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 2740796**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer**

30 Prioridad:

**04.08.2011 JP 2011171300**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.09.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 634 249 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 farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer

5 **Campo técnico**

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

10 **Técnica anterior**

El cáncer es la principal causa de muerte. En la actualidad, esta enfermedad se trata principalmente mediante terapia quirúrgica, en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del reciente desarrollo de novedosas técnicas quirúrgicas o del descubrimiento de novedosos agentes anticancerosos, el tratamiento actual del cáncer tiene un resultado insuficientemente mejorado, salvo para algunos tipos de cáncer. Con los avances recientes de la biología molecular o la inmunología del cáncer, se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente con el cáncer, antígenos de cáncer que son reconocidos por las células T citotóxicas, genes que codifican tales antígenos de cáncer y similares, lo que genera expectativas acerca de una terapia para el cáncer específica dirigida a los antígenos del cáncer (bibliografía no de patente 1).

Con el fin de reducir los efectos secundarios de la terapia del cáncer, es deseable que los péptidos, polipéptidos, o proteínas que se reconocen como antígenos del cáncer apenas existan en las células normales y que existan específicamente en las células cancerosas. En 1991, Boon et al. (Ludwig Institute for Cancer Research, Bélgica) aislaron el antígeno MAGE 1 del melanoma humano que era reconocido por células T CD8 positivas mediante el método de clonación de la expresión de ADNc utilizando una línea celular de cáncer autóloga y células T reactivas contra el cáncer (bibliografía no de patente 2). Posteriormente, se ha presentado un procedimiento SEREX (identificación serológica de antígenos mediante la clonación de la expresión recombinante), que adopta un abordaje de clonación de la expresión génica para identificar antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos producidos *in vivo* en respuesta al cáncer autólogo de un paciente con cáncer (bibliografía no de patente 3 y bibliografía de patente 1). De acuerdo con este método, se aislaron algunos antígenos cancerosos que apenas se expresan en células normales pero que se expresan específicamente en células cancerosas (bibliografía no de patente 4 a 9). Además, actualmente se encuentran en ensayo clínico dirigido a algunos de los antígenos de cáncer aislados una terapia celular que usa inmunocitos que reaccionan específicamente con antígenos de cáncer o una inmunoterapia específica para el cáncer que emplea vacunas o similares que comprenden antígenos de cáncer.

En los últimos años, han surgido por todo el mundo diversos fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer que se dirigen a proteínas antigénicas en las células cancerosas. Estos fármacos han llamado la atención debido a su eficacia como agentes terapéuticos específicos para el cáncer. la mayoría de las proteínas antigénicas utilizadas como diana por los fármacos, sin embargo, se expresan también en células normales. A causa de la administración de los anticuerpos, se dañan las células cancerosas así como las células normales que expresan los antígenos, dando como resultado desventajosamente efectos adversos. Por lo tanto, si pudieran identificarse los antígenos del cáncer que se expresan específicamente en la superficie de las células cancerosas y se pudieran usar como fármacos anticuerpos que se dirigen a estos antígenos, podría esperarse que estos fármacos de anticuerpos proporcionen un tratamiento con menos efectos adversos.

La proteína citoplasmática y asociada a proliferación 1 (CAPRIN-1, acrónimo de *Cytoplasmic- and proliferation-associated protein 1*) se conoce como una proteína intracelular que se expresa después de la activación o división celular de las células normales que están en fase de reposo y forma gránulos de estrés citoplasmáticos con los ARN en las células para participar en la regulación del transporte y en la traducción de los ARNm. Se ha descubierto que esta proteína se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, se está estudiando como diana para fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer (bibliografía de patente 2).

Lista de citas

55 **Bibliografía de patente**

Bibliografía de patente 1: Patente de EE.UU. n.º 5698396

Bibliografía de patente 2: WO2010/016526

60 **Bibliografía no de patente**

Bibliografía no de patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, Volumen 24, págs. 55-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)

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

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

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

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

**Sumario de la invención**

Problema de la técnica

10 Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo que se dirija a CAPRIN-1 expresado específicamente en la superficie de las células cancerosas y que tenga mejor actividad antitumoral que los anticuerpos convencionales, y proporcionar el anticuerpo para su uso como agente para el tratamiento y/o la prevención del cáncer.

15 Solución al problema

La presente invención tiene los siguientes aspectos:

20 La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con un polipéptido CAPRIN-1 parcial que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo como principio activo y una combinación farmacéutica como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona dicha composición farmacéutica y dicha combinación farmacéutica, cada una para su uso en un  
 25 método de tratamiento y/o prevención del cáncer.

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

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

35 En una realización alternativa, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, anticuerpo biespecífico).

Efectos ventajosos de la invención

40 El anticuerpo contra la CAPRIN-1 de acuerdo con 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.

Descripción de las realizaciones

45 El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido parcial predeterminado de CAPRIN-1 y tiene actividad antitumoral. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es más específicamente un anticuerpo que reconoce (es decir, que tiene reactividad inmunológica) un polipéptido parcial de una proteína CAPRIN-1 (polipéptido parcial de CAPRIN-1) que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5. La presente invención ha revelado que este anticuerpo presenta actividad antitumoral. La presente invención se refiere a todos los anticuerpos que se unen a los fragmentos de proteínas  
 50 CAPRIN-1 como se ha descrito anteriormente y que presentan actividad antitumoral.

El anticuerpo contra CAPRIN-1 según la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo que puede ejercer actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, anticuerpos recombinantes, por ejemplo, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos y anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos humanos y sus fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv. Estos anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante métodos conocidos por los expertos en la materia. Deseablemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1 o un polipéptido parcial de la misma, es decir, se une a la proteína CAPRIN-1 a través de la reacción antígeno-anticuerpo, preferentemente, se une específicamente a la proteína CAPRIN-1. En este contexto, la frase "se une específicamente a la proteína CAPRIN-1" significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRIN-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas. El anticuerpo según la presente invención es, preferentemente, un anticuerpo monoclonal. Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal, siempre y cuando se puedan producir de forma estable anticuerpos homogéneos. En el caso de un sujeto humano, es deseable usar  
 65 un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir el rechazo.

El anticuerpo contra el polipéptido CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención puede examinarse con respecto a su actividad antitumoral, tal como se describe más adelante, examinando in vivo la inhibición del crecimiento tumoral en un animal con cáncer o examinando ex vivo la presencia o ausencia de actividad citotóxica mediada por inmunocitos o por el complemento exhibida por el anticuerpo contra células tumorales que expresan el polipéptido.

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

10 En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá con mayor detalle.

<Preparación del antígeno para la preparación de anticuerpos>

15 Las proteínas o fragmentos de las mismas usadas como antígenos sensibilizantes para obtener el anticuerpo contra CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención no están limitadas por la especie animal de la que proceden, incluyendo seres humanos, perros, ganado bovino, caballos, ratones, ratas, y pollos. Las proteínas o los fragmentos de las mismas, sin embargo, se seleccionan, preferentemente, a la vista de su compatibilidad con las células progenitoras para su uso en fusión celular. En general, se prefieren las proteínas procedentes de mamíferos. En particular, se prefieren las proteínas procedentes de seres humanos. Por ejemplo, cuando CAPRIN-1 es CAPRIN-1 humana, pueden usarse proteínas de CAPRIN-1, péptidos parciales de las mismas, o células que expresan CAPRIN-1 humana.

20 Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y los homólogos de las mismas pueden obtenerse, por ejemplo, accediendo a GenBank (NCBI, EE.UU.) y usando los algoritmos 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).

30 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 CAPRIN-1 humana, la CAPRIN-1 diana es ácidos nucleicos o proteínas que consisten en secuencias que tienen de un 70 % a un 100 %, preferentemente de un 80 % a un 100 %, más preferentemente de un 90% a un 100 %, aún más preferentemente de un 95% a un 100 %, por ejemplo, de un 97 % a un 100 %, de un 98 % a un 100 %, de un 99% a un 100 % o de un 99,5 % a un 100% de identidad de secuencia respecto de la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos del ORF o la porción madura de la secuencia de referencia. En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos respecto del número total de aminoácidos (o bases nucleotídicas) cuando se alinean dos secuencias de tal forma que pueda lograrse el máximo grado de similitud o identidad con o sin huecos introducidos.

40 Como los fragmentos de cada proteína CAPRIN-1, los que comprenden un epítipo (o un determinante antigénico), que es la unidad más pequeña reconocida por un anticuerpo, tienen longitudes en el intervalo desde la longitud de aminoácidos del epítipo hasta menos de la longitud completa de la proteína. El epítipo se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos. El fragmento de la proteína CAPRIN-1 que se va a utilizar en la preparación del anticuerpo de acuerdo con la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5 reconocida por el anticuerpo de la presente invención.

50 Los fragmentos polipeptídicos que comprenden las proteínas CAPRIN-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas anteriores, se pueden sintetizar según métodos de síntesis química, por ejemplo, los métodos de Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experimentation Course en inglés) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). Además, estos polipéptidos pueden sintetizarse mediante métodos convencionales usando diversos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado.

55 Como alternativa, pueden prepararse polinucleótidos que codifican los polipéptidos usando estrategias de ingeniería genética conocidas en la materia (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.) e incorporarse en vectores de expresión, que después se introducen en células huésped para producir los polipéptidos en las célula huésped. De este modo, se pueden obtener las proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de polipéptidos de las mismas de interés.

65 Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse fácilmente mediante estrategias de ingeniería genética conocidas en la técnica o métodos rutinarios que usan sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el mercado. Por ejemplo, puede prepararse un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del gen de CAPRIN-1 mediante la PCR usando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como molde y un par de

- cebadores diseñados para que sean capaces de amplificar la secuencia de nucleótidos. Las condiciones de reacción para esta PCR pueden determinarse de manera adecuada. Ejemplos de las condiciones pueden incluir, aunque no de forma limitativa, 30 ciclos que implican cada uno etapas de reacción que consisten en 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante de 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (elongación)
- 5 usando ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa, Pfu polimerasa o similares) y un tampón para PCR que contiene Mg<sup>2+</sup>, seguido de reacción a 72 °C durante 7 minutos. La estrategia de la PCR, sus condiciones, etc. se describen en, por ejemplo, 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, capítulo 15).
- 10 Además, pueden prepararse sondas o cebadores adecuados basándose en información acerca de las secuencias de nucleótidos del gen de CAPRIN-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRIN-1 y usarse en la exploración de, por ejemplo, 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 proteínas de CAPRIN-1. Los ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos procedentes de los testículos o de cánceres o tumores, tales como leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y
- 15 cáncer colorrectal. Estas operaciones, incluyendo la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidas para los expertos en la materia y pueden efectuarse de acuerdo con métodos descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, 2ª edición, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989), and Ausubel et al. (*ibid.*). Los ADN que codifican las proteínas CAPRIN-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas pueden obtenerse a partir de los ADN obtenidos de este modo.
- Las células huésped en las que se introducen los vectores de expresión pueden ser cualquier célula capaz de expresar los péptidos anteriores. Los ejemplos de células procariotas incluyen, aunque no de forma limitativa, *E. coli*.
- 25 Los ejemplos de células eucariotas incluyen, aunque no de forma limitativa: células de mamífero, tales como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una línea celular de riñón embrionario humano HEK293; la línea celular de piel embrionaria de ratón NIH3T3; células de levadura, tales como células de levadura en gemación y de levadura en fisión; células del gusano de la seda; y células de huevo de *Xenopus*.
- 30 En caso de usar células procariotas como células huésped, los vectores de expresión usados pueden tener un origen que permita la replicación en las células procariotas, un promotor, un sitio de unión a ribosomas, un sitio de clonación múltiple, un terminador, un gen de resistencia a fármacos, un gen complementario auxótrofo, etc. Los ejemplos de vectores de expresión para *E. coli* pueden incluir la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET y sistemas de expresión pGEX. Los ADNc que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos
- 35 vectores de expresión, con los que posteriormente se transforman las células hospedadoras procariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células hospedadoras procariotas. A este respecto, los polipéptidos pueden expresarse como proteínas de fusión con otras proteínas.
- 40 En caso de usar células procariotas como células huésped, se pueden usar vectores de expresión para células eucarióticas que tengan un promotor, una región de cote y empalme, un sitio de adición de poli (A), etc. como vectores de expresión. Ejemplos de tales vectores de expresión pueden incluir los vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que anteriormente, los ADNc que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que
- 45 posteriormente se transforman las células huésped eucariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células huésped eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, los polipéptidos pueden expresarse como varias proteínas de fusión marcadas con el marcador His (por ejemplo, de (His)<sub>6</sub> a (His)<sub>10</sub>), el marcador FLAG, el marcador myc, el marcador HA, GFP o similares.
- 50 Los vectores de expresión pueden introducirse en las células hospedadoras usando métodos de sobra conocidos, tales como electroporación, un método de fosfato de calcio, un método de liposoma, un método de DEAE dextrano, microinyección, infección vírica, lipofección y unión con péptidos que penetran en las células.
- 55 El polipéptido de interés puede aislarse y purificarse a partir de las células hospedadoras mediante una combinación de operación de separación conocidos en la materia. Los ejemplos de los mismos incluyen, aunque no de forma limitativa, tratamiento con un desnaturalizante (por ejemplo, urea) o un tensioactivo, ultrasonificación, digestión enzimática, precipitación salina, fraccionamiento y precipitación de disolvente, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de electroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.
- 60

Con el fin de preparar el anticuerpo de acuerdo con la presente invención, los antígenos preparados de este modo pueden usarse como antígenos sensibilizantes como se describe más adelante.

## &lt;Estructura del anticuerpo&gt;

Los anticuerpos (inmunoglobulina) normalmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden cada una al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas, salvo las 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 se conecta a una cadena pesada a través de un solo enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas cambia entre los diferentes isotipos de inmunoglobulinas. Cada una de las cadenas pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (región VL) en un extremo y tiene una región constante sencilla en el otro extremo. La región constante de la cadena ligera se alinea con la primera región constante de la cadena pesada, mientras que el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Regiones particulares denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables del anticuerpo exhiben una variabilidad específica e imparten especificidad de unión al anticuerpo. Las porciones relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera completos comprenden cada uno cuatro FR conectadas mediante tres CDR. Estas tres CDR se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden, desde el extremo N-terminal de la cadena pesada. De forma análoga, 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 en cada cadena se mantienen próximas entre sí mediante las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR en la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión anticuerpo-antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, por ejemplo, implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fc $\gamma$ , semivida/velocidad de eliminación mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada de complemento.

## &lt;Preparación de anticuerpos&gt;

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención significa un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1 de longitud completa o con un fragmento de la misma. En particular, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es un anticuerpo que se une inmunológicamente a un polipéptido parcial de una proteína CAPRIN-1 (polipéptido parcial de CAPRIN-1) que es un péptido que contiene un epítipo y que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5. El anticuerpo de la presente invención reconoce, preferentemente, un epítipo que consiste en aproximadamente DE 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos, en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5. Este anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención puede unirse específicamente a la proteína CAPRIN-1 de longitud completa. El anticuerpo de la presente invención puede obtenerse seleccionando un anticuerpo que se une inmunológicamente a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5, de acuerdo con un método de rutina de entre los anticuerpos obtenidos con las proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de las mismas como antígenos.

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo de unirse al antígeno de CAPRIN-1 (una proteína CAPRIN-1 de longitud completa o un polipéptido parcial de la misma) *in vivo*. Mediante dicha unión, el anticuerpo de la presente invención frente a CAPRIN-1, el anticuerpo ejerce la función del daño (por ejemplo, matar, suprimir, o causar la regresión de) las células tumorales. El anticuerpo de la presente invención puede dañar A tumores, tales como cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, 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.

El anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo. Ejemplos del tipo del anticuerpo según la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena única y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv ). Además, 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.

Además, el anticuerpo puede modificarse mediante acetilación, formilación, amidación, fosforilación, PEGilación o similares, así como glicosilación.

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

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 que expresan CAPRIN-1 se administran a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de este ratón. Después de la separación de los esplenocitos, se fusionan las células con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto inhibitor del crecimiento de células cancerosas se

seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridomas). Como alternativa, se pueden seleccionar los clones que producen anticuerpos que se unen a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5. Se aíslan y se cultivan los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de las células cancerosas o los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra los polipéptidos de SEQ ID NO: 5, etc. El anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante purificación a partir del sobrenadante de cultivo de acuerdo con un método general de purificación por afinidad.

Los hibridomas productores del anticuerpo monoclonal pueden prepararse, por ejemplo, del modo siguiente. En primer lugar, se inmuniza a los animales con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización implica generalmente, inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea los antígenos sensibilizantes a mamíferos. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen con o se suspenden en PBS (suero salino tamponado con fosfato), suero salino fisiológico o similares en una cantidad adecuada y después se mezclan, si se desea, con una cantidad adecuada de un adyuvante convencional, por ejemplo, adyuvante completo de Freund. Después de emulsionar, se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 21 días. Como alternativa, puede usarse un vehículo adecuado para la inmunización con antígenos sensibilizantes.

Después de la confirmación de un aumento del nivel del anticuerpo deseado en el suero del animal (normalmente, mamífero) así inmunizado, los inmunocitos se recogen del animal y se someten a fusión celular. Ejemplos preferidos de los inmunocitos incluyen, particularmente, esplenocitos.

Se pueden usar células de mieloma de mamífero, por ejemplo, como células progenitoras compañeras para u fusión con los inmunocitos. En la materia se conocen 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 (deSt. 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 usan, preferentemente, como las células de mieloma.

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

Más específicamente, la fusión celular se lleva a cabo, por ejemplo, en presencia de un promotor de la fusión celular en un medio nutriente convencional. Por ejemplo, como promotor de fusión se usa polietilenglicol (PEG virus de hemaglutinante de Japón (VHJ)). Si se desea, puede añadirse además un adyuvante, tal como dimetilsulfóxido, para potenciar la eficacia de la fusión.

La proporción entre los inmunocitos y las células de mieloma puede ajustarse de manera arbitraria. Por ejemplo, la cantidad de los inmunocitos se ajusta, preferentemente, a de 1 a 10 veces la cantidad de las células de mieloma. Los ejemplos del medio que puede usarse en la fusión celular incluyen los medios RPMI1640 y MEM, adecuados para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma, así como medios convencionales para su uso en este tipo de cultivo celular. Además, puede usarse un complemento de suero, tal como suero de ternero fetal (FCS) en combinación con estas células.

Para la fusión celular, se mezclan exhaustivamente los inmunocitos y las células de mieloma en una cantidad predeterminada del medio. Normalmente se añade una solución de PEG (meso molecular promedio: por ejemplo, de aproximadamente 1000 a 6000) precalentada a aproximadamente 37 °C a la mezcla a una concentración del 30 al 60 % (p/v) y se mezcla con la misma para formar los hibridomas de interés. Posteriormente, se repiten los procedimientos de añadir secuencialmente un medio adecuado y retirar el sobrenadante por centrifugación para eliminar los agentes de fusión celular o similares no favorables para el crecimiento de los hibridomas.

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

Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, pueden obtenerse hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (por ejemplo, actividad inhibidora del crecimiento celular) sensibilizando a linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con el virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas *in vitro* y fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma de origen humano capaces de dividirse permanentemente, por ejemplo, U266 (n.º de acceso TIB196).

Los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal preparados de este modo pueden subcultivarse en un medio convencional y también pueden almacenarse durante un largo periodo en nitrógeno líquido.

5 Específicamente, los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados se usan como antígenos sensibilizantes en la inmunización de acuerdo con un método de inmunización convencional. Los inmunocitos obtenidos se fusionan con células progenitoras conocidas en la materia de acuerdo con un método de fusión celular convencional. Las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) pueden explorarse mediante un método de exploración convencional para preparar el anticuerpo de interés.

10 Otro ejemplo de anticuerpo que puede usarse en la presente invención es un anticuerpo policlonal. El anticuerpo policlonal puede obtenerse, por ejemplo, del modo siguiente:

Se obtiene suero de animales pequeños, tales como ratones, ratones productores de anticuerpos humanos o conejos inmunizados con proteínas CAPRIN-1 naturales o proteínas CAPRIN-1 recombinantes expresadas como  
15 proteínas de fusión con GST o similares en microorganismos, tales como *E. coli*, o péptidos parciales de las mismas. Como alternativa, se puede obtener suero de mamíferos inmunizados con polipéptidos de fragmentos de CAPRIN-1, comprendiendo cada uno la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más, preferentemente un 85 % o más, más preferentemente un 90 % o más, aún más preferentemente un 95 % o más de identidad de secuencia con respecto a la secuencia de aminoácidos  
20 (preferentemente, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) o polipéptidos, cada uno de los cuales comprende (preferentemente consiste en) un epítipo que consiste en aproximadamente de 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos, en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más, preferentemente un 85%  
25 o más, más preferentemente un 90% o más, aún más preferentemente de un 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos, como agentes sensibilizantes. Este suero se purifican usando, por ejemplo, precipitación por sulfato de amonio, columnas de proteína A o de proteína G, cromatografía de intercambio iónico de DEAE o columnas de afinidad acopladas con proteínas CAPRIN-1 o péptidos sintéticos para preparar el anticuerpo policlonal anti-CAPRIN-1. El anticuerpo policlonal de la presente invención incluye anticuerpos obtenidos de animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) inmunizados con proteínas CAPRIN-1.

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

40 Los antígenos pueden prepararse de acuerdo con, por ejemplo, un método que usa células animales (publicación de patente JP (Kohyo) n.º 2007-530068 A (2007)) o un método que usa baculovirus (por ejemplo, la publicación internacional N.º WO 098/46777). Pueden unirse antígenos que tienen baja inmunogenicidad a macromoléculas inmunogénicas, tales como albúmina, para la inmunización. Los antígenos se pueden administrar con adyuvantes para la inmunización.

45 Como alternativa, e anticuerpo de la presente invención puede obtenerse como anticuerpos recombinantes, que se producen usando una técnica de ingeniería genética que implica: clonar los genes de anticuerpos de hibridomas; incorporar los genes de anticuerpo en vectores adecuados; e introducir los 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, se sintetizan ADNc para la región variable (región V) del anticuerpo a partir de los ARNm de hibridomas usando una retrotranscriptasa. Después de la obtención de los ADNc que codifican las regiones V de anticuerpo de interés, se ligan los ADN con ADN que codifican las regiones constantes (regiones C) de anticuerpo deseadas. Los productos de ligamiento resultante se incorporan en vectores de expresión. Como alternativa, los ADN que codifican la región V de anticuerpo pueden incorporarse en vectores de expresión que contienen ADN de región C de anticuerpo. Estos ADN se incorporan en vectores de expresión para ser expresados bajo el control de regiones de control de la expresión, por ejemplo, un  
50 potenciador y un promotor. A continuación, las células hospedadoras pueden transformarse con los vectores de expresión resultante y se deja que expresen anticuerpos.

60 El anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es, preferentemente, un anticuerpo monoclonal. Como alternativa, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo genéticamente modificado (anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, etc.), o similares.

65 El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, de rata, de conejo y de pollo), anticuerpos monoclonales quiméricos y similares. El anticuerpo monoclonal puede prepararse mediante el cultivo de hibridomas obtenidos mediante la fusión entre esplenocitos de mamíferos no humanos (por ejemplo, ratones o ratones productores de anticuerpos humanos, pollos y conejos) inmunizados con proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de los mismos y células

de mieloma. Como alternativa, se pueden incorporar genes de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera a partir de esplenocitos de animales no humanos (por ejemplo, ratones, ratones productores de anticuerpos humanos, pollos y conejos) inmunizados con proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de las mismas mediante conectores en vectores fagémidos, que, a continuación, se introducen en *E. coli* de manera que los anticuerpos de cadena única se expresan a través de fagos auxiliares para preparar los anticuerpos de interés. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo preparado a partir de una combinación de secuencias derivadas de distintos animales y es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo de ratón y regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico puede prepararse usando un método conocido en la materia que implica, por ejemplo: ligar los ADN que codifican regiones V de anticuerpo con ADN que codifican regiones C de anticuerpo humano; que incorpora los productos de unión resultantes en vectores de expresión; e introducir los vectores en huéspedes de modo que se producen anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales que tienen reactividad inmunológica con un polipéptido parcial de CAPRIN-1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5 y tienen un efecto antitumoral se preparan mediante métodos que se describen más adelante en los ejemplos. Estos anticuerpos monoclonales comprenden cada uno, por ejemplo, una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 19, 58, 63, 69 o 77 y una región variable de la cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13, 23, 53, 62, 65, 73 o 81. En estos anticuerpos monoclonales, la región VH puede comprender CDR1 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, 16, 55, 66 o 74, CDR2 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, 17, 56, 67 o 75 y CDR3 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 18, 57, 68 o 76 y la región VL puede comprender CDR1 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, 20, 50, 59, 70 o 78, CDR2 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 21, 51, 60, 64, 71 o 79 y CDR3 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 22, 52, 61, 72 u 80.

El anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano reformado, es un anticuerpo diseñado por ingeniería genética. El anticuerpo humanizado se construye injertando CDR de anticuerpo procedentes de un animal inmunizado en las regiones determinantes de la complementariedad de un anticuerpo humano. También se conoce una estrategia general de recombinación génica para este propósito.

Específicamente, por ejemplo, las secuencias de ADN diseñadas para unir CDR de anticuerpos de ratón, conejo y pollo, y regiones marco (FR, *framework regions*) de anticuerpo humano se sintetizan mediante PCR usando varios oligonucleótidos preparados que tienen porciones terminales que se solapan entre sí. Los ADN obtenidos se ligan con ADN que codifican regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión, que después se introducen en huéspedes para la producción de anticuerpos para obtener el anticuerpo de interés (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP239400 y la publicación internacional n.º WO96/02576). Las FR de anticuerpo humano conectadas a través de las CDR se seleccionan de tal forma que las regiones determinantes de la complementariedad forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si fuese necesario, pueden sustituirse aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de anticuerpo de tal forma que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante forman un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. et al., *Cancer Research* 1993, 53: 851-856). Además, pueden reemplazarse estas regiones marco con regiones marco procedentes de diversos anticuerpos humanos (véase la publicación internacional n.º WO99/51743).

Las regiones marco de anticuerpo humano conectadas a través de las CDR se seleccionan de tal forma que las regiones determinantes de la complementariedad forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si fuese necesario, pueden sustituirse aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de anticuerpo de tal forma que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante forman un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. et al., *Cancer Research* 1993, 53: 851-856).

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

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

Los ejemplos de anticuerpos modificados pueden incluir anticuerpos unidos a varias moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). En el anticuerpo modificado de la presente invención, no se limita la sustancia que se va a

unir. Para obtener dicho anticuerpo modificado, el anticuerpo modificado puede modificarse químicamente. Ya se ha descrito exhaustivamente en la técnica un método para esto.

5 En este contexto, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que un anticuerpo específico tiene actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente, el anticuerpo específico tiene la función de dañar el tumor y esencialmente no provoca rechazo cuando se aplica a seres humanos, por ejemplo. Los ejemplos de dicha actividad pueden incluir actividad inhibitoria del crecimiento celular y actividad de unión.

10 Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido, que comprende introducir una mutación en un polipéptido, es de sobra conocido. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden introducir de manera adecuada una mutación en el anticuerpo de la presente invención usando mutagénesis de sitio dirigido (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. Estados Unidos.* 82, 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) o similares, preparando de este modo un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

20 Puede obtenerse un anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRIN-1 descrita anteriormente o un fragmento del polipéptido de CAPRIN-1 incluido en el mismo mediante un método conocido generalmente por los expertos en la materia. Por ejemplo, el anticuerpo puede obtenerse mediante un método que implica determinar el epítipo de la proteína CAPRIN-1 reconocida por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 que tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de células cancerosas obtenido mediante el método convencional anterior (por ejemplo, mapeo de epítopos o un método para identificar un epítipo como se describe más adelante) y preparar un anticuerpo usando un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo en forma de inmunógeno o un método que implica determinar un epítipo para un anticuerpo preparado mediante un método convencional y seleccionar un anticuerpo que reconoce al mismo epítipo que aquel para el anticuerpo anti-CAPRIN-1. En este contexto, el "epítipo" se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, preferentemente de 8 a 11 aminoácidos.

35 El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con CAPRIN-1, o un anticuerpo que reconoce específicamente a CAPRIN-1 o que un anticuerpo que se une específicamente a CAPRIN-1 y muestra actividad citotóxica o un efecto inhibitorio del crecimiento tumoral sobre el cáncer. El anticuerpo tiene, preferentemente, una estructura que provoque poco o ningún rechazo en animales receptores. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos humanos-de ratón), anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano o tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera que consiste en las regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2, y CDR3) derivadas de un anticuerpo de animal no humano y regiones marco derivadas de un anticuerpo humano. Como alternativa, estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de las cadenas pesada y ligera derivadas de un anticuerpo de animal no humano y regiones constantes de las cadenas pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo de la presente invención es preferentemente los dos anticuerpos anteriores.

45 Dichos anticuerpos recombinantes pueden producirse del modo siguiente: los ADN que codifican anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ser humano, de ratón, de rata, de conejo y de pollo) contra la CAPRIN-1 humana se clonan a partir de las células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas, y se usan como moldes para preparar ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera y pesada de los anticuerpos mediante RT-PCR o similares. Las respectivas secuencias de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada y las secuencias respectivas de CDR1, CDR2 y CDR3 en cada región se determinan basándose en el sistema de numeración de la UE de Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)).

55 Un ADN que codifica cada región variable o un ADN que codifica cada CDR se prepara usando una técnica de ingeniería genética (Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos mencionados anteriormente se pueden preparar inmunizando a animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) con CAPRIN-1 humana y, después, fusionando esplenocitos extirpados de los animales inmunizados con células de mieloma. Aparte de esto, se preparan ADN que codifican regiones variables y constantes de las cadenas ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano, si es necesario, usando una técnica de ingeniería genética o un sintetizador de ADN.

65 Para el anticuerpo humanizado, puede prepararse un ADN que codifica el anticuerpo humanizado produciendo ADN en los que las secuencias que codifican las CDR en los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas ligera o pesada derivadas de anticuerpos humano se sustituyen por las correspondientes secuencias que codifican

CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo), ligando los ADN resultantes con los ADN que codifican regiones constantes de las cadenas ligera o pesada derivadas de anticuerpos humanos, respectivamente.

5 Para el anticuerpo quimérico, se puede preparar un ADN que codifica el anticuerpo quimérico ligando ADN que codifican regiones variables de las cadenas ligera o pesada de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo) con los ADN que codifican regiones constantes de las cadenas ligera o pesada derivadas de anticuerpos humanos.

10 El anticuerpo monocatenario significa un anticuerpo en el que las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se unen linealmente entre sí mediante un enlazador. Puede prepararse un ADN que codifica el anticuerpo monocatenario ligando 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 la cadena ligera. En este contexto, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera proceden ambas de un anticuerpo humano o proceden de un anticuerpo humano en el que las CDR individuales se han sustituido por CDR de un anticuerpo procedente de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consiste en 12 a 19 aminoácidos. Los ejemplos de los mismos incluyen  $(G_4S)_3$  que consiste en 15 aminoácidos (G.B. Kim et al., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

20 El anticuerpo biespecífico (diacuerpo) significa un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dos epítopos diferentes. Puede prepararse un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico, por ejemplo, ligando un ADN que codifica una región variable A de la cadena pesada, un ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera, un ADN que codifica una región variable B de la cadena pesada y un ADN que codifica una región variable A de la cadena ligera en este orden, en el que el ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera y el ADN que codifica la región variable B de la cadena pesada están ligados mediante un ADN que codifica un enlazador como se ha descrito anteriormente. En este contexto, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera proceden todas de un anticuerpo humano o proceden de un anticuerpo humano en el que las CDR individuales se han sustituido por CDR de un anticuerpo procedente de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo).

30 Los ADN recombinantes preparados de este modo pueden incorporarse en uno o más vectores adecuados, que después se introducen en células hospedadoras (por ejemplo, células de mamífero, células de levadura y células de insecto) y los ADN se (co)expresan para producir anticuerpos recombinantes (véase, 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).

35 Los ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparados mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluyen los siguientes anticuerpos (a) a (g) obtenidos en los ejemplos que se describen a continuación:

40 (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDR de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12 (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 13);

45 (b) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 20, 21 y 22 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 19 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 23);

50 (c) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 53);

55 (d) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 59, 60 y 61 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 62);

60 (e) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 59, 64 y 61 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 65);

65 (f) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 66, 67 y 68, y una región variable de la cadena ligera

que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 69 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 73);

5 (g) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 74, 75 y 76, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80 (por ejemplo, un anticuerpo construido usando una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 77 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 81);

10 En este contexto, las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y las SEQ ID NO: 16, 17 y 18 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de ratón. Las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, y las SEQ ID NO: 50, 51 y 52 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de ratón. Las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, las SEQ ID NO: 66, 67 y 68, y las SEQ ID NO: 74, 75 y 76 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena pesada de anticuerpo de pollo. Las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 59, 60 y 61, las SEQ ID NO: 59, 64 y 61, las SEQ ID NO: 70, 71 y 72, y las SEQ ID NO: 78, 79 y 80 corresponden a CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de una región variable de la cadena ligera de anticuerpo de pollo.

20 Los ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo monocatenario o el anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos descritos a continuación. Los siguientes anticuerpos son realizaciones ilustrativas del anticuerpo (a), pero también pueden existir realizaciones similares de los otros anticuerpos (b) a (g).

25 (i) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de anticuerpo humano y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de un anticuerpo humano.

30 (ii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de un anticuerpo humano, una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano, una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco procedentes de anticuerpo humano y una región constante de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpo humano.

35 (iii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9, una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano, una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, y una región constante de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano.

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

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

55 Las secuencias particulares anteriores de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera y las CDR en los anticuerpos mencionados anteriormente se proporcionan únicamente con fines ilustrativos y está claro que el anticuerpo de la presente invención no está limitado por las secuencias particulares. Se preparan hibridomas capaces de producir anticuerpos humanos anti-CAPRIN-1 humana o anticuerpos animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos de ratón) diferentes de los descritos específicamente anteriormente y se recuperan anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas y se determina si los anticuerpos recuperados son o no los anticuerpos de interés usando la actividad de unión inmunológica contra CAPRIN-1 humana y la actividad citotóxica como indicadores. Los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal de interés se identifican de este modo. Después, a partir de los hibridomas se preparan los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de interés y se secuencian, tal como se ha descrito anteriormente. Los ADN se usan para la preparación de los diferentes anticuerpos.

65 El anticuerpo descrito anteriormente puede ser cualquiera de los anticuerpos (a) a (g), etc. que tiene la sustitución,

delección o adición de uno o varios aminoácidos, en particular, en una región distinta de las CDR, por ejemplo, en una secuencia de la región marco y/o una secuencia de la región constante, siempre que el anticuerpo tenga una especificidad tal que pueda reconocer específicamente a CAPRIN-1. En el presente documento, el término "varios" significa, preferentemente, De 2 a 5, más preferentemente 2 o 3.

5 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,  $10^{13} M^{-1}$  para la proteína CAPRIN-1 o el fragmento de la misma.

10 El anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con un agente antitumoral. La conjugación del anticuerpo con el agente antitumoral se puede realizar a través de un espaciador que tiene un grupo reactivo con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o similar (por ejemplo, un grupo succinimidilo, un grupo formilo, un grupo 2-piridiltio, un grupo maleimidilo, un grupo alcoxycarbonilo o un grupo hidroxilo).

15 Los ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las bibliografías, por ejemplo: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, piposulfán, benzodopa, carbocuoona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiestatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliceamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidracida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazonico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

45 Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente antitumoral para producir un mayor efecto terapéutico. Esta estrategia puede adaptarse a un paciente con cáncer que expresa CAPRIN-1 antes o después de una intervención quirúrgica. Esta estrategia puede aplicarse, particularmente después de la cirugía, a un cáncer que expresa CAPRIN-1, que se ha tratado convencionalmente solo con un agente antitumoral solo, para producir una mayor prevención de la recidiva del cáncer o para la prolongación del tiempo de supervivencia.

50 Los ejemplos del agente antitumoral usado en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, piposulfán, benzodopa, carbocuoona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiestatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido de mecloretamina clorhidrato, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliceamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano,

lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidracida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazonico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sales farmacéuticamente aceptables (conocidas en la técnica) y derivados (conocidos en la técnica) de los mismos. Ente estos agentes antitumorales, ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina se usan particularmente preferentemente.

El anticuerpo de la presente invención puede unirse a un radioisótopo conocido en la bibliografía, etc., tales como  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{175}\text{Lu}$  o  $^{176}\text{Lu}$ . Preferentemente, se usa un radioisótopo eficaz para el tratamiento o el diagnóstico de tumores. Dicho radioisótopo también se incluye en el alcance del agente antitumoral de acuerdo con la presente invención.

<Identificación del epítipo>

El anticuerpo de la presente invención reconoce la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5 como un epítipo, tal como se muestra más adelante en los ejemplos. Un ejemplo de un método para confirmar el epítipo para el anticuerpo de la presente invención comprende inmovilizar el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 (epítipo) sobre una placa y evaluar el anticuerpo para su reactividad frente a este epítipo. Específicamente, el polipéptido de SEQ ID NO: 5 se inmoviliza sobre una placa a través de la reacción con un grupo funcional electrofílico unido mediante un separador de, por ejemplo, oligoetilenglicol a la placa y, después, se hace reaccionar con el anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, se puede hacer reaccionar un anticuerpo secundario marcado con HRP (peroxidasa de rábano picante) capaz de unirse al anticuerpo de la presente invención para evaluar la reactividad del anticuerpo (para confirmar el epítipo para el anticuerpo de la presente invención). El polipéptido de SEQ ID NO: 5 a inmovilizar sobre una placa puede usarse como una forma que consiste en la secuencia de SEQ ID NO: 5 o una forma parcialmente modificada (por ejemplo, una forma modificada del polipéptido en el residuo en N-terminal o C-terminal con varios aminoácidos o una proteína tal como KLH o una forma modificada del polipéptido con una proteína MAP), siempre y cuando el anticuerpo de la presente invención se una a estas formas polipeptídicas.

Algunos anticuerpos de la presente invención pueden no reaccionar con el polipéptido de SEQ ID NO: 5 (es decir, el epítipo no está confirmado) en el método anterior. En tal caso, el epítipo para el anticuerpo de la presente invención puede confirmarse haciendo reaccionar el anticuerpo con el antígeno en condiciones de solución que facilitan la unión antígeno-anticuerpo como se describe en el Ejemplo 2, obteniendo el complejo antígeno-anticuerpo resultante mediante un método de inmunoprecipitación y, después, separar un resto polipeptídico unido al anticuerpo y determinar su secuencia de aminoácidos. El antígeno puede ser un polipéptido que consiste en la secuencia de la SEQ ID NO: 5, la suya parcialmente modificada, o una proteína CAPRIN-1, siempre y cuando un epítipo reactivo con el anticuerpo de la presente invención pueda ser confirmado mediante los métodos mencionados anteriormente.

<Efecto antitumoral>

Se considera que el efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRIN-1 usado en la presente invención sobre las células de cáncer que expresan CAPRIN-1 se crean mediante el siguiente mecanismo: citotoxicidad dependiente de anticuerpo mediada por células efectoras (ADCC) contra las células que expresan CAPRIN-1 y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra las células que expresan CAPRIN-1. Sin embargo, el alcance de la presente invención no pretende estar limitado por el mecanismo.

Se sabe que el efecto antitumoral basado en el mecanismo se correlaciona con el número de moléculas diana de unión a anticuerpos expresadas en la superficie de las células cancerosas (Niwa R., Clinical Cancer Research (2005) Mar 15; 11 (6): 2327-2336). El número de moléculas diana expresadas en la superficie de las células cancerosas se puede examinar usando un kit de ensayo existente capaz de medir el número de moléculas en la superficie celular. Específicamente, el número de moléculas dianas de unión a anticuerpos se puede determinar mediante: reacción de células cancerosas con, por ejemplo, anticuerpos contra las moléculas diana como anticuerpos primarios; la reacción con ellos de anticuerpos marcados fluorescentemente contra los anticuerpos primarios, junto con perlas de la curva de calibración con el número de moléculas previamente conocido; la medición de la intensidad media de fluorescencia de las muestras; y la determinación del número de moléculas diana sobre la base de la curva de calibración obtenida.

Por lo tanto, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se utilizará en la presente invención puede analizarse en cuanto a su actividad determinando *ex vivo* la actividad de ADCC o la actividad de CDC frente a células cancerosas que expresan CAPRIN-1 o examinando el número de moléculas de CAPRIN-1 expresadas en la superficie de las células cancerosas en el caso de usar el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de acuerdo con la presente invención como un anticuerpo primario como se muestra específicamente a continuación en los Ejemplos.

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se utilizará en la presente invención se une a las proteínas CAPRIN-1 en las

células cancerosas y exhibe un efecto antitumoral a través de la actividad. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención se considera que es útil en el tratamiento o prevención del cáncer. Específicamente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, que como principio activo comprende el anticuerpo anti-CAPRIN-1. El anticuerpo anti-CAPRIN-1 que se va a utilizar para el propósito de administración a cuerpos humanos (terapia de anticuerpos) es, preferentemente, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

El anticuerpo anti-CAPRIN-1 con mayor afinidad de unión a una proteína CAPRIN-1 en la superficie de las células cancerosas ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por lo tanto, puede esperarse que el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tenga un efecto antitumoral más fuerte debido a la alta afinidad de unión por la proteína CAPRIN-1 y, por tanto, se puede usar como una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene una constante de afinidad de unión con la constante de asociación (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  $10^{13} M^{-1}$ , tal como se ha descrito anteriormente.

Un mayor número de moléculas de CAPRIN-1 que pueden unirse a anticuerpos anti-CAPRIN-1 en la superficie de las células cancerosas produce una actividad antitumoral más fuerte. Deseablemente, con el fin de producir el efecto antitumoral esperado, el número de moléculas de CAPRIN-1 a las que se unen los anticuerpos es  $10^4$  o más, preferentemente  $10^5$  o más moléculas de CAPRIN-1 por célula cancerosa, medidos usando el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención. El tumor (células cancerosas) que tiene un gran número de moléculas de CAPRIN-1 en su superficie celular es particularmente preferido como cáncer sujeto a la administración del anticuerpo de la presente invención.

<Unión a células que expresan antígenos>

Puede determinarse la capacidad del anticuerpo para unirse a CAPRIN-1 mediante el uso de un ensayo de unión usando, por ejemplo, ELISA, transferencia de Western, inmunofluorescencia y análisis por citometría de flujo, tal como se describe en los ejemplos.

<Tinción inmunohistoquímica>

Puede analizarse la reactividad del anticuerpo que reconoce a CAPRIN-1 con CAPRIN-1 mediante un método inmunohistoquímico de sobra conocido para los expertos en la materia usando una sección congelada fijada en paraformaldehído o acetona o una sección incluida en parafina fijada con paraformaldehído de un tejido obtenido de un paciente durante una intervención quirúrgica o de un animal que porta un xenoinjerto de tejido inoculado con una línea celular que expresa CAPRIN-1 ya sea de manera espontáneamente o después de su transfección.

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

<Composición farmacéutica y medios para tratar y/o prevenir el cáncer>

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

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

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

Los ejemplos específicos de estos cánceres incluyen, aunque no de forma limitativa, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama de tipo complejo, tumor mixto maligno de glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer microcítico, cáncer macrocítico, glioma que es tumor de tejido neuroepitelial, ependimoma ventricular, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de células pequeñas a medias, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transversal, cáncer de colon sigmoide, cáncer rectal, cáncer de ovarios epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromales, carcinoma pancreático ductal, carcinoma pancreático ductal invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia papilar-mucinoso intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreoblastoma,

cistadenocarcinoma seroso, tumor papilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinoma, neoplasia endocrina múltiple de tipo-1 (síndrome de Wermer), tumor de células de islote no funcionales, somatostatina y VIPoma.

5 El sujeto (paciente) como receptor es, preferentemente, mamíferos, por ejemplo, mamíferos incluyendo primates, mascotas, ganado y animales de deporte, y, de manera particularmente preferente, seres humanos, perros y gatos.

10 Cuando se usa el anticuerpo de la presente invención es una composición farmacéutica, la composición farmacéutica puede formularse mediante un método conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede usarse en forma de una inyección parenteral de una solución o suspensión  
15 aséptica con agua o cualquier otro líquido farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede formularse con el anticuerpo mezclado en una forma de dosis unitaria requerida para la práctica farmacéutica generalmente aceptada, en combinación con vehículos o medios farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, suero salino fisiológico, aceite vegetal, un emulsionante, un agente de suspensión, un  
20 tensioactivo, un estabilizante, un agente aromatizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, etc., según sea adecuado. La cantidad del principio activo en dicha preparación se determina de tal forma que puede obtenerse una dosis adecuada dentro del intervalo indicado.

20 Puede formularse una composición aséptica para inyección de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional usando un vehículo, tal como agua destilada inyectable.

25 Los ejemplos de soluciones acuosas para inyección incluyen suero salino fisiológico, soluciones isotónicas que contienen glucosa y otros adyuvantes, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico. Estas soluciones pueden usarse en combinación con un solubilizante adecuado, por ejemplo, un alcohol (particularmente etanol) o un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 80 (TM) o HCO-60.

30 Los ejemplos de soluciones oleosas incluyen aquellos que usan aceite de sésamo y aceite de soja. Las soluciones pueden usarse en combinación con un solubilizante, tal como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Se puede añadir a las soluciones un tampón (por ejemplo, una solución de tampón fosfato o una solución de tampón de acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencílico o fenol), o un antioxidante. Las soluciones para inyección preparadas de este modo se cargan normalmente en ampollas adecuadas.

35 La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Los ejemplos de estas formas de dosificación incluyen inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar y agentes de administración percutánea. Los ejemplos de inyecciones incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea, mediante los cuales puede administrarse la composición farmacéutica de manera sistémica o local.

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

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

55 La presente invención abarca además medios para tratar y/o prevenir el cáncer, mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral tal como se ha ilustrado anteriormente o una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral a un sujeto. El anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo pueden administrarse simultáneamente con o por separado del agente antitumoral al sujeto. En caso de administrar por separado estas composiciones farmacéuticas, cualquiera de ellas puede administrarse en primer lugar o después. Sus intervalos de dosificación, dosis, las vías de  
60 administración y el número de dosis pueden seleccionarse de manera adecuada por un especialista. Las otras formas de dosificación farmacéuticas para su administración simultánea incluyen también, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formuladas cada una mezclando el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo y el agente antitumoral en un vehículo (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores acerca de la composición, formulación, rutas de administración, dosis, cáncer, etc. referentes a las  
65 composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que contienen el anticuerpo de la presente invención

también pueden aplicarse a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen el agente antitumoral mencionadas anteriormente.

5 Por lo tanto, la presente invención también proporciona una combinación farmacéutica como se define en las reivindicaciones, que comprende la composición farmacéutica de la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral tal como se ha ilustrado anteriormente y un método para tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende la administración de la misma. 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>

15 La presente invención proporciona además un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención o el fragmento (fragmento de unión a anticuerpos) del mismo. El ADN puede ser un ADN que codifica las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo o puede ser un ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo. El ADN puede ser también un ADN que codifica cada una o una combinación de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo. Un ADN de este tipo incluye, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada a que comprende las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera a que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, en el caso del anticuerpo mencionado anteriormente (a).

25 Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) codificadas por el ADN que tiene estas secuencias sirven como regiones que determinan la especificidad del anticuerpo. Las secuencias que codifican las otras regiones (es decir, regiones constantes y regiones marco) del anticuerpo pueden, por tanto, ser secuencias derivadas de otros anticuerpos. En este contexto, "otros anticuerpos" también incluyen anticuerpos derivados de organismos no humanos, pero son, preferentemente, los derivados de seres humanos desde el punto de vista de reducir las reacciones adversas. Específicamente, en el ADN de la presente invención, las regiones que codifican cada región marco y cada región constante en las cadenas pesada y ligera comprenden, preferentemente, secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpos humanos correspondientes.

Otros ejemplos del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluyen un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera a que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13, en el caso del anticuerpo mencionado anteriormente (a). En este contexto, un ejemplo de las secuencias de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9 es la secuencia de nucleótidos: de la SEQ ID NO: 14. Un ejemplo de las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13 es la secuencia de nucleótidos: de la SEQ ID NO: 15. Cuando dicho ADN comprende regiones que codifican regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, cada una de las regiones comprende, preferentemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una correspondiente secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos de cada región constante de las cadenas pesada y ligera).

45 Estos ADN de anticuerpos se pueden obtener, por ejemplo, mediante los métodos descritos anteriormente, o por el método siguiente. En primer lugar, los ARN totales se preparan a partir de hibridomas que producen el anticuerpo de la presente invención utilizando un kit de extracción de ARN comercialmente disponible y los ADNc se sintetizan a partir de ellos utilizando transcriptasa inversa y cebadores aleatorios o similares. Posteriormente, los ADNc que codifican anticuerpos se amplifican mediante PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos para secuencias conservadas de regiones variables en genes conocidos de cadena pesada o ligera de anticuerpo de ratón. Las secuencias que codifican las regiones constantes se pueden obtener mediante amplificación por PCR de las secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos del ADN se puede incorporar en un plásmido o un fago para la secuenciación, por ejemplo, y se determina de acuerdo con un método convencional.

55 La presente invención proporciona además los siguientes polipéptidos y ADN relacionados con los anticuerpos (a) a (g) mencionados anteriormente:

(i) un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 19, 58, 63, 69 y 77, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 14 y 24);

(ii) un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 23, 53, 62, 65, 73 y 81, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 15, 25 y 54);

65 (iii) polipéptidos de la CDR de la cadena pesada seleccionados del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, las SEQ ID NO: 66, 67 y 68, y las SEQ ID NO: 74, 75 y 76, y un ADN que codifica los polipéptidos; y

(iv) polipéptidos de la CDR de la cadena ligera seleccionados de las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, las SEQ ID NO: 59, 60 y 61, las SEQ ID NO: 59, 64 y 61, las SEQ ID NO: 70, 71 y 72, y las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, y un ADN que codifica los polipéptidos.

5 Estos polipéptidos y ADN pueden prepararse usando técnicas de ingeniería genética como se ha descrito anteriormente.

### 10 Ejemplos

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

#### 15 Ejemplo 1 Análisis de la expresión de CAPRIN-1 en cada tejido

Se investigó la expresión del gen de la CAPRIN-1 en tejidos normales de perro y ser humano y diversas líneas celulares por el método de RT-PCR de acuerdo con el ejemplo 1 (4) del documento WO2010/016526. Como resultado, se observó una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que la expresión se observó en cáncer de mama canino y tejidos de adenocarcinoma. Adicionalmente, como resultado del examen de la expresión en tejidos humanos, la expresión se observó solo en el testículo entre tejidos normales, como con el gen CAPRIN-1 canino. Por el contrario, la expresión se detectó en muchos tipos de líneas celulares de cáncer, 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 de páncreas (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPc-3), entre las células cancerosas. Estos resultados demostraron que la expresión de CAPRIN-1 no se encuentra en tejidos normales aparte del testículo, mientras que CAPRIN-1 se expresa en las líneas celulares de cáncer de mama y en las líneas celulares de cáncer de páncreas.

#### 30 Ejemplo 2 Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón contra CAPRIN-1

##### (1) Preparación del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1

100 µg de proteínas de CAPRIN-1 humana (que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2) preparadas en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 se mezclaron con una cantidad igual de adyuvante MPL + TDM (Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se usó como una solución de antígeno por ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (preparado por Japan SLC, Inc.). Después, se realizaron 7 administraciones cada 1 semana para completar la inmunización. Tres días después de la inmunización final, el bazo de cada ratón se escindió y se molió entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricados por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante se repitieron tres veces para obtener esplenocitos. Los esplenocitos obtenidos se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas de la ATCC) en una proporción de 10:1. Se añadió a la mezcla celular una solución de PEG preparada mezclando 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, que se calentó a 37 °C, con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH) y luego se dejó reposar durante 5 minutos para la fusión celular. Después de la eliminación del sobrenadante mediante centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS suplementado con 2 % de equivalente de una solución HAT (Gibco) (medio selectivo HAT). Esta suspensión se sembró en quince placas de 96 pocillos (Nunc) a 100 µl/pocillo. Los esplenocitos y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo durante 7 días a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % para obtener hibridomas.

Los hibridomas preparados se sometieron a detección selectiva para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas frente a las proteínas CAPRIN-1 como indicador. Una solución de 1 µg/ml de la proteína CAPRIN-1 preparada en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 se añadió a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de seroalbúmina bovina al 0,5 % (BSA) (fabricada por Sigma-Aldrich Corp.) a 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo tres veces con 400 µl de PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos (H + L) IgG anti-ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después de revelarse el color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producían anticuerpos que tenían una alta absorbancia.

Se añadieron los hibridomas seleccionados a una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, se observaron los hibridomas que forman colonias únicas en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se sometieron a detección selectiva para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas frente a la proteína CAPRIN-1 como indicador. Una solución de 1 µg/ml de la proteína CAPRIN-1 preparada en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 se añadió a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar 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 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo tres veces con 400 µl de PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos (H + L) IgG anti-ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después de revelarse el color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 88 líneas de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales reactivos con la proteína CAPRIN-1.

A continuación, se exploraron estos anticuerpos monoclonales respecto a los anticuerpos reactivos con la superficie de las células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron 10<sup>6</sup> células de una línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 V en un tubo para microcentrifugación de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido anteriormente y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavado con PBS, se añadieron a los mismos anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejó reposar durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se efectuó la misma operación que antes usando el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad diluido 500 veces con un medio para cultivo de hibridoma, en lugar de los anticuerpos, para preparar un control. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal (n.º 1) que tenían una intensidad de fluorescencia mayor que la del control, es decir, reactivo con la superficie de las células de cáncer de mama .

#### (2) Identificación del epítipo de CAPRIN-1 reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 N.º 1

el anticuerpo monoclonal anticuerpo anti-CAPRIN-1 N.º 1 reactivo a la superficie de células cancerosas obtenido en la sección (1) se usó para identificar una región de epítipo de CAPRIN-1 reconocida por el mismo. Se disolvieron 100 µg de proteínas CAPRIN-1 recombinantes en un tampón de disolución libre de inhibidor de proteína y se hizo reaccionar con el anticuerpo monoclonal de ratón N.º 1. Se añadió una enzima digestiva tripsina o quimotripsina a la solución para llevar a cabo la reacción de digestión a una temperatura adecuada. Después de la reacción, se añadió un vehículo de proteína G Sepharose a la mezcla de reacción, se hizo reaccionar con la misma y se precipitó por centrifugación. Después de la retirada del sobrenadante, el vehículo se lavó con un tampón de disolución y PBS y se disolvió en ácido fórmico al 0,1 %, y se recuperó el sobrenadante. La muestra del sobrenadante recuperada se aplicó a una columna de fase inversa (HLB Extraction Cartridge (Oasis)) para la eliminación del anticuerpo para obtener una solución de muestra. La muestra obtenida se sometió a cromatografía de líquidos de fase inversa (Chromatography Nanosystem (KYA Tech Corp.)) para recuperar una solución que solo contenía péptidos, que luego se introdujo en un espectrómetro de masas en tándem de espectrómetro de masas cuadrupolo-TOF (Waters-MicroMass) para análisis MS/MS para detectar los péptidos contenidos en la muestra. Como resultado, un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 se identificó como una secuencia parcial de CAPRIN-1 reconocida por el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 N.º 1.

#### (3) Preparación de anticuerpos monoclonales de ratón n.º 2 y n.º 3

De manera similar a la descrita en la sección (1), se mezcló una proteína de fusión de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 identificada en la sección (2) y una proteína vehículo KLH (hemocianina de lapa californiana) como un inmunógeno con una cantidad igual de un adyuvante TiterMax Gold<sup>(R)</sup> (CytRx Corp.) y esta mezcla se administró por vía subcutánea a una dosis de 20 µg/inyección a cada ratón a intervalos de 7 días. Después de la administración con cuatro inyecciones en total, se obtuvieron esplenocitos del ratón 3 días después de la inmunización final y se fusionaron con células de mieloma de ratón de la misma manera que en la sección (1) para producir hibridomas. Después, se analizaron los anticuerpos, como indicador, la reactividad de los anticuerpos contenidos en los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas producidos con una solución de 1 µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 o una proteína de fusión (utilizada como inmunógeno) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una proteína vehículo de KLH. La solución de 1 µg/ml de proteínas CAPRIN-1 preparadas en el ejemplo 3 del documento WO2010/016526 y la proteína de fusión (30 µg/ml) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una proteína vehículo KLH se añadieron cada una a 100 µl/pocillo a placas de 96 pocillos y se dejaron reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, a los mismos se añadió una solución Blockace (DS Pharma Biomedical Co., a 400 µl/pocillo y se dejó

5 reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo con PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos (H + L) IgG anti-ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.)  
 10 diluidos 5000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante de 5 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después de revelarse el color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron los hibridomas que producían anticuerpos que tenían una alta absorbancia.

15 Se añadieron los hibridomas seleccionados a una placa de 96 pocillos a 0,3 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, se observaron los hibridomas que forman colonias únicas en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se sometieron a detección selectiva de mismo modo que anteriormente para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas frente a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 como una secuencia de CAPRIN-1 parcial como un indicador para obtener hibridomas que producen anticuerpos contra el aminoácido de SEQ ID NO: 5.

20 Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas obtenidos se exploraron para detectar los anticuerpos reactivos con la superficie de las células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron  $10^6$  células de una línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB231 V en un tubo para microcentrifugación de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido anteriormente y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavado con PBS, se añadieron a los mismos anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que  
 25 contenía FBS al 0,1 % y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se efectuó la misma operación que antes para preparar una muestra usando el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad diluido 500 veces con un medio para cultivo de hibridoma o preparar una muestra de control negativo mediante la reacción únicamente con anticuerpos secundarios, en lugar de los anticuerpos. Como resultado, se obtuvieron 2 anticuerpos monoclonales (n.º 2 y n.º 3) que tenían una intensidad de fluorescencia mayor que la del control negativo, es decir, reactivo con la superficie de las células de cáncer de mama .

35 Los anticuerpos monoclonales de ratón 2 y 3 obtenidos se examinaron en cuanto a su reacción específica con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 como una secuencia parcial de CAPRIN-1 utilizada como inmunógeno. Una solución de 30 µg/ml de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 preparada con una solución acuosa de carbonato de sodio 0,1 M y una secuencia parcial de CAPRIN-1 libre de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 se añadieron a una placa de 96 pocillos Immobilizer Amino para ELISA (Nunc) a 100 µg/ml y se hizo reaccionar durante un día entero y noche a 4 °C para unir los péptidos a los pocillos. Se añadió una solución acuosa de carbonato de sodio 0,1 M que contenía etanolamina 10 mM a los pocillos unidos a péptido y se dejó reposar a  
 40 temperatura ambiente durante 1 hora. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo con PBS-T. A continuación, se añadió una solución Blockace a 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo con PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal n.º 2 de ratón a los mismos a 50 µl/pocillo y se hizo reaccionar temperatura ambiente durante 1 hora. Después, cada pocillo se lavó con PBS.T y anticuerpos IgG anti-ratón marcados con HRP (H+L) (fabricados por Invitrogen ) diluidos 5000 veces con Soluciones a 50 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó completamente con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante de 5 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después de revelarse el color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm  
 50 usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, los anticuerpos monoclonales n. 2 y n.º 3 no reaccionaron con la secuencia parcial de CAPRIN-1 libre de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5, sino que reaccionó específicamente solo con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. Los resultados demostraron que el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 contiene una región de epítipo para los anticuerpos anti-CAPRIN-1 n.º 2 y n.º 3.

### 55 Ejemplo 3 Preparación de anticuerpo monoclonal de pollo contra CAPRIN-1

Se prepararon anticuerpos monoclonales derivados de pollo utilizando como inmunógeno una proteína de fusión de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 identificada en el Ejemplo 2 (2) y una proteína vehículo KLH (hemocianina de lapa californiana). Se mezclaron 300 µg del inmunógeno con una cantidad igual de un adyuvante completo de Freund. Esta mezcla se usó como una solución de antígeno por pollo. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada pollo de 7 semanas de edad. Después, se realizaron 7 administraciones cada 4 semana para completar la inmunización. Cuatro días después de la inmunización final, el bazo de cada pollo se escindió y se molió entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricados por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante se repitieron tres veces para obtener esplenocitos. Los esplenocitos obtenidas se mezclaron con células de mieloma de pollo deficientes en cadena ligera establecidas a partir de pollos mediante transformación

utilizando virus de la reticuloendoteliosis aviar, en una proporción de 5:1. Se añadió a la mezcla celular una solución de PEG preparada mezclando 200 µl de un medio IMDM que contenía FBS al 10 %, que se calentó a 37 °C, con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH) y luego se dejó reposar durante 5 minutos para la fusión celular. Después de la eliminación del sobrenadante mediante centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 300 ml de un medio IMDM que contenía 10% de FBS suplementado con 2 % de equivalente de una solución HAT (Gibco) (medio selectivo HAT). Esta suspensión se sembró en treinta placas de 96 pocillos (Nunc) a 100 µl/pocillo. Los esplenocitos y las células de mieloma de pollo se fusionaron mediante cultivo durante 7 días a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 % para obtener hibridomas. Después, se analizaron los anticuerpos, para determinar, como indicador, la reactividad del anticuerpo contenido en los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas producidos con una solución de proteínas CAPRIN-1 preparadas como se describe en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 o una proteína de fusión (utilizada como inmunógeno) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una proteína vehículo de BSA. Específicamente, La solución de 1 µg/ml de proteínas CAPRIN-1 preparada en el ejemplo 3 del documento WO2010/016526 y la proteína de fusión (1 µg/ml) de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y la proteína vehículo BSA se añadieron cada una a 50 µl/pocillo a placas de 96 pocillos y se dejaron reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, a los mismos se añadió una solución Blockace (DS Pharma Biomedical Co., a 300 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo con PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a 50 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadieron a los mismos anticuerpos IgY anti-pollo marcados con HRP (fabricados por KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories, diluidos 1000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió a la misma una solución de sustrato de OPD de 50 µl/pocillo y se dejó reposar durante de 5 a 15 minutos para provocar la reacción de color. Después de revelarse el color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 2N a 50 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 490 nm y 630 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producían anticuerpos que tenían una alta absorbancia.

Se añadieron los hibridomas seleccionados a una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, se observaron los hibridomas que forman colonias únicas en los pocillos. Las células en estos pocillos se cultivaron adicionalmente y se realizó detección selectiva de los hibridomas clonados para, como indicador, determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas frente a las proteínas CAPRIN-1 o la reactividad de los anticuerpos contra la proteína de fusión (usada como inmunógeno) de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y la proteína vehículo de BSA, para obtener anticuerpos monoclonales de pollo.

A continuación, se exploraron estos anticuerpos monoclonales respecto a los anticuerpos reactivos con la superficie de las células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron  $2 \times 10^5$  células de una línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 V en un tubo para microcentrifugación de 1,5 ml. Se añadieron 50 µl del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavado con PBS, se añadieron a los mismos anticuerpos IgG (H+L) de cabra anti-pollo marcados con FITC (fabricados por Southern Biotech) diluidos 100 veces con PBS que contenía FBS al 0,5 % y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se realizó la misma operación que la anterior utilizando un medio para cultivo de hibridomas para preparar una muestra de control negativo. Como resultado, se seleccionaron 4 anticuerpos monoclonales de pollo (anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4) que tenían una intensidad de fluorescencia más intensa que la del control, es decir, reactivos con la superficie de células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Estos anticuerpos pueden unirse a CAPRIN-1 expresada en la superficie de las células de cáncer de mama.

Ejemplo 4. Caracterización del anticuerpo monoclonal seleccionado

#### (1) Caracterización del anticuerpo monoclonal de ratón

Los fragmentos de amplificación de genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos monoclonales de ratón obtenidos en el Ejemplo 2 se obtuvieron según un método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526 y se analizaron para sus secuencias de genes y secuencias de aminoácidos codificadas por el mismo. La secuencia génica resultante que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 derivado de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 24 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la EQ ID NO: 19; y la secuencia génica que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 25 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 23. La secuencia génica resultante que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 2 derivado de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 14 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 9; y la secuencia génica que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 15 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 13. La secuencia génica resultante que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 3 derivado de ratón se muestra en la SEQ ID NO: 14 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 9; y la secuencia génica que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo

se muestra en la SEQ ID NO: 54 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 53.

En otras palabras, se descubrió que el anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 19 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 23, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 20, 21 y 22, respectivamente. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal de ratón n.º 2 comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 13, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, respectivamente. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal de ratón n.º 3 comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 53, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52, respectivamente.

## (2) Caracterización del anticuerpo monoclonal de pollo

Se obtuvieron fragmentos de amplificación de genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos monoclonales de pollo (anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4) obtenidos en el Ejemplo 3 se obtuvieron según un método descrito en el Ejemplo 4 del documento WO2011/096519 y se analizaron para sus secuencias de genes y secuencias de aminoácidos codificadas por el mismo. La secuencia de aminoácidos resultante de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 derivado de pollo se muestra en la SEQ ID NO: 58 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 62. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 2 derivado de pollo se muestra en la SEQ ID NO: 63 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 65. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 3 derivado de pollo se muestra en la SEQ ID NO: 69 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 73. La secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 4 derivado de pollo se muestra en la SEQ ID NO: 77 y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera del mismo se muestra en la SEQ ID NO: 81.

En otras palabras, se descubrió que el anticuerpo monoclonal n.º 1 de pollo comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 62, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 59, 60 y 61, respectivamente. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal n.º 2 de pollo comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 65, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 59, 64 y 61, respectivamente. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal n.º 3 de pollo comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 69 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 73, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 66, 67 y 68, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72, respectivamente. Se descubrió que el anticuerpo monoclonal n.º 4 de pollo comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 77 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 81, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 74, 75 y 76, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80, respectivamente.

Ejemplo 5 Preparación de anticuerpos policlonales contra el polipéptido parcial de CAPRIN-1 presente en la superficie de la célula cancerosa

Con el fin de obtener anticuerpos policlonales contra polipéptidos parciales de CAPRIN-1 presentes en la superficie de las células cancerosas, se sintetizaron un polipéptido (péptido derivado de CAPRIN-1 mostrado en SEQ ID NO: 5) que comprende las regiones de epítipo para los anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-1 n.º 1, n.º 2 y n.º 3, un polipéptido que tiene una región de los restos de aminoácidos 50 a 98 en la secuencia de aminoácidos de CAPRIN-1 humana de SEQ ID NO: 2, y un polipéptido que tiene una región de restos de aminoácidos 233 a 305 de SEQ ID NO: 2. Cada 1 mg de estos péptidos se mezclaron como un antígeno con un volumen igual de una solución de adyuvante de Freund incompleto (IFA). Esta mezcla se administró por vía subcutánea al conejo cuatro veces cada dos semanas. Después, se recogió sangre de la misma para obtener un antisuero que contiene los anticuerpos policlonales contra cada antígeno. El antisuero se purificó adicionalmente usando un vehículo proteína G (fabricado

por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.), seguido de reemplazo con PBS, para obtener anticuerpos policlonales contra los polipéptidos parciales de CAPRIN-1 presentes en la superficie de la célula cancerosa. Además, el suero de un conejo que no recibió ningún antígeno se preparó por purificación usando un vehículo de proteína G de la misma manera que anteriormente y se usó como un anticuerpo de control.

5 Ejemplo 6 Análisis de la expresión de CAPRIN-1 en las células cancerosas

10 A continuación, Se examinaron 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) que se había observado que tenían un nivel de CAPRIN-1 alto para determinar su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie de las células. Se centrifugaron  $5 \times 10^5$  células de las líneas celulares de cáncer de mama humano que se había observado anteriormente que tenían la expresión génica en un tubo para microcentrifugación de 1,5 ml. Después de añadir 2  $\mu\text{g}$  (5  $\mu\text{l}$ ) de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRIN-1 preparados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 5, as células se mezclaron adicionalmente con 95  $\mu\text{l}$  de PBS que contenía suero bovino fetal al 0,1 % y se dejaron en reposo 15 hora en hielo. Después de lavar con PBS, la solución resultante se mezcló con 2  $\mu\text{l}$  de anticuerpos IgG de cabra anti-conejo marcados con Alexa 488 (fabricados por Invitrogen Corp.) y 98  $\mu\text{l}$  de PBS que contenía suero bovino fetal (FBS) al 0,1 % y se dejó en reposo durante 30 horas en hielo. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se realizó la misma operación que anteriormente utilizando los anticuerpos de control preparados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 20 5 en lugar de los anticuerpos policlonales contra los péptidos derivados de CAPRIN-1 para preparar un control. Como resultado, las células cancerosas tratadas con los anticuerpos anti-CAPRIN-1 mostraron todas una intensidad de fluorescencia al menos 35 % más fuerte que la del control. Esto demostró que las proteínas CAPRIN-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. Las velocidades de mejora en la intensidad de fluorescencia se expresan como las velocidades de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en las líneas celulares respectivas, que se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula.

Velocidad de incremento de la intensidad de fluorescencia media (velocidad de mejora de la intensidad de fluorescencia) (%) =  $((\text{MFI de las células reaccionadas con los anticuerpos anti-CAPRIN-1}) - (\text{MFI Control})) / (\text{MFI Control}) \times 100$

30 Además, también se midió la intensidad de fluorescencia en 3 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2 y A498), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), una línea celular de cáncer de pulmón (QG56), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (HeLa), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), 2 líneas celulares de tumores cerebrales (T98G y U87MG), una línea celular de cáncer gástrico (MKN28), una línea celular de cáncer de colorrectal (Lovo) y líneas celulares de cáncer pancreático (Capan- 2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3) usando el mismo procedimiento que el anterior. Como resultado, todas las células de cáncer tenían una intensidad de fluorescencia de, al menos, un 35 % más fuerte que la del control.

40 Como con los resultados obtenidos anteriormente, también se confirmó la expresión de CAPRIN-1 utilizando el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 (anticuerpo monoclonal de ratón N.º 1) que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 19 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 23, el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 (anticuerpo monoclonal de ratón N.º 2) que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 13 y el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 (anticuerpo monoclonal de ratón N.º 3) que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 53, que se obtuvieron en el ejemplo 2 y el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 de pollo n.º 1 que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 58 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 62, el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 de pollo N.º 2 que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 65, el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 de pollo N.º 3 que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 69 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 73 y el anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 de pollo N.º 4 que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 77 y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 81 (anticuerpos monoclonales de pollo n.º1 a n.º4), que se obtuvieron en el ejemplo 3.

55 Ejemplo 7 Tinción inmunohistoquímica

(1) Expresión de CAPRIN-1 en tejidos normales de ratón y caninos

60 Se exsanguinaron ratones (Balb/c, hembras) y perros (perros beagle, hembras) con anestesia con éter y con anestesia con ketamina/isoflurano y se sometieron a sección abdominal. Después, cada órgano (Estómago, hígado, globo ocular, timo, músculo, médula ósea, útero, intestino delgado, esófago, corazón, riñón, glándula salivar, intestino grueso, glándula mamaria, cerebro, pulmones, piel, glándula suprarrenal, ovarios, páncreas, bazo y vejiga urinaria) se transfirió a una placa de 10 cm que contenía PBS. Cada órgano se cortó y abrió en PBS y luego se sometió a fijación por perfusión durante una noche con una solución 0,1 M de tampón fosfato (pH 7,4) que contenía un 4 % de paraformaldehído (PFA). Se desechó el perfundido y la superficie tisular de cada órgano se aclaró con PBS. Cada tejido se introdujo en una solución de PBS que contenía 10 % de sacarosa en un tubo de centrifugación

de 50 ml y se agitó a 4 °C durante 2 horas utilizando un rotor. La solución se sustituyó con una solución de PBS que contenía un 20 % de sacarosa y la solución resultante se dejó en reposo a 4 °C hasta que el tejido precipitó. Después, la solución se sustituyó con una solución de PBS que contenía un 30% de sacarosa y la solución resultante se dejó en reposo a 4 °C hasta que el tejido precipitó. Cada tejido se retiró y las porciones necesarias se escindieron con un escalpelo. A continuación, se aplicó un compuesto OCT (Tissue Teck) y se esparció por toda la superficie. Después, del tejido se montó en Cryomold. El Cryomold se colocó en hielo seco para la congelación rápida congelación del tejido y, después, el tejido se cortó en secciones de 10 a 20 µm de grosor utilizando un criostato (fabricado por Leica Biosystems) y, después, se secaron al aire, junto con el portaobjetos de vidrio, durante 30 minutos con un secador de pelo, para preparar un portaobjetos de vidrio con una lámina de tejido colocada sobre el mismo. A continuación, el portaobjetos de vidrio se colocó en una botella de tinción llena con PBS-T (solución salina que contenía 0,05 % de Tween 20) y los procedimientos de sustitución de PBS-T por uno recién preparado cada 5 minutos se llevaron a cabo tres veces. El agua en exceso alrededor de cada sección se retiró con una toallita Kimwipe. La sección sobre el portaobjetos de vidrio se rodeó con un bolígrafo Dako (fabricado por Dako Japan Inc.). Después, se aplicaron al reactivo de bloqueo de Ig de ratón MOM (Vectastain) para los tejidos de ratón y una solución de PBS-T que contenía FBS al 10 % para los tejidos caninos como soluciones de bloqueo y el portaobjetos de vidrio se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora en una cámara húmeda.

A continuación, se preparó un anticuerpo policlonal reactivo a la superficie de células de cáncer contra el péptido derivado de CAPRIN-1 (SEQ ID NO: 5) preparado en el Ejemplo 5 en una solución de 10 µg/ml con una solución de bloqueo y se aplicó esta solución. El portaobjetos de vidrio se dejó reposar durante una noche a 4 °C en una cámara húmeda. Después de lavar tres veces con PBS-T durante 10 minutos, se aplicaron anticuerpos anti-IgG marcados con biotina MOM (Vectastain) diluidos 250 veces con una solución de bloqueo y el portaobjetos de vidrio se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora en una cámara de humedad. Después de lavar tres veces con PBS-T durante 10 minutos, se aplicó el reactivo avidina-biotina ABC (Vectastain) y el portaobjetos de vidrio se dejó reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos en una cámara de humedad. Después de lavar tres veces con PBS-T durante 10 minutos, se aplicó una solución de tinción de DAB (10 mg of DAB + 10 µl de 30% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/50 ml de tris-HCl 0,05 M (pH 7.6)) y el portaobjetos de vidrio se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos en una cámara de humedad. Después de enjuagar con agua destilada, se le aplicó un reactivo de hematoxilina (fabricado por Dako Japan Inc.), y el portaobjetos e vidrio se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 minuto y después se aclaró con agua destilada. El portaobjetos e vidrio se colocó en soluciones de etanol al 70 %, 80 %, 90 %, 95 % y 100 % en este orden durante 1 minuto por solución y, después, se dejó reposar durante la noche en xileno. El portaobjetos de vidrio se extrajo y se montó en medio de montaje Glycergel (fabricado por Dako Japan Inc.), seguido de observación. Como resultado, la expresión intracelular de CAPRIN-1 se observó ligeramente en los respectivos tejidos de la glándula salival, riñón, colon y estómago. Su expresión, sin embargo, no se observó en la superficie celular de estos tejidos. Además, no se observó expresión en los tejidos derivados de los otros órganos.

## (2) Expresión de CAPRIN-1 en tejido de cáncer de mama canino

Se usaron tejidos de cáncer de mama congelados de perros diagnosticados patológicamente como cáncer de mama maligno en la preparación de portaobjetos de sección congelada y tinción inmunohistoquímica usando los anticuerpos policlonales contra el péptido derivado de CAPRIN-1 (SEQ ID NO: 5) preparado de acuerdo con el ejemplo 5, De la misma manera que anteriormente. Como resultado, la expresión de CAPRIN-1 se observó en tejidos de cáncer de mama canino.

## (3) Expresión de CAPRIN-1 en varios tejidos de cáncer humano

En la tinción inmunohistoquímica se usaron muestras de diversos tejidos de cáncer de cáncer humano embebidas en parafina (fabricadas por US Biomax, Inc.) utilizando los anticuerpos policlonales (preparados en el Ejemplo 5) contra el péptido derivado de CAPRIN-1 (SEQ ID NO: 5) de la misma manera que anteriormente. Como resultado, la expresión de CAPRIN-1 se observó en cáncer de esófago, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de vejiga urinaria y cáncer de cuello uterino.

## Ejemplo 8 Preparación de anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón

El fragmento de amplificación génica preparado en el Ejemplo 4 que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 14) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 2 se trató en ambos extremos con una enzima de restricción, después se purificó y se insertó de acuerdo con un convencional en un vector pcDNA4/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de la cadena H de IgG<sub>1</sub> humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 48. Además, el fragmento de amplificación génica que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 15) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 2 se trató en ambos extremos con una enzima de restricción, después se purificó y se insertó de acuerdo con un convencional en un vector pcDNA3.1/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de la cadena L de IgG<sub>1</sub> humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 49.

A continuación, el vector recombinante que tiene el inserto de la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena pesada (SEQ ID NO: 14) del anticuerpo monoclonal de ratón n. 2 y el vector recombinante que tiene el inserto de la secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera (SEQ ID NO: 15) del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 2 se introdujeron en células CHO-K1 (obtenidas en Riken Cell Bank).  
 5 Específicamente, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células CHO-K1 en un medio F12 de Ham (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos y se lavaron con PBS(-). Después, se añadió un medio F12 de Ham fresco que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores en 30  $\mu$ l de OptiMEM (fabricado por Invitrogen Corp.) con 30  $\mu$ l de reactivo de transfección Polyfect (fabricado por Qiagen N.V.) y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 cotransfectadas  
 10 con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 % suplementado con 200  $\mu$ g/ml de Zeocin (fabricado por Invitrogen Corp.) y 200  $\mu$ g/ml de geneticina (fabricado por Roche Diagnostics KK) y, después, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo para preparar una línea celular que produce de forma estable un anticuerpo monoclonal n.º 1 (n.º 1) quimérico humano-de ratón que tiene las regiones variables del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón. También se prepararon líneas celulares que producían de manera estable un anticuerpo monoclonal quimérico de ratón-humano n.º 2 (n.º 2) o un anticuerpo monoclonal quimérico humano n.º 3 (n.º 3) de la misma manera que anteriormente para los anticuerpos monoclonales de ratón n.º 2 y n.º 3.

20 Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150-cm<sup>2</sup> a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml en 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían n.º 1, n.º 2 o n.º 3.

Además, se prepararon líneas celulares que producían de forma estable anticuerpos comparativos quiméricos de humano - ratón 1 a 11 de la misma manera que anteriormente, respectivamente, sobre la base de los siguientes anticuerpos monoclonales derivados de ratón anti-CAPRIN-1 descritos en el documento WO2010/016526 como anticuerpos comparativos: un anticuerpo comparativo 1 que tiene la región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 26 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 27; un anticuerpo comparativo 2 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 28 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 29; un anticuerpo comparativo 3 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 30 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 31; un anticuerpo comparativo 4 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 32 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 33; un anticuerpo comparativo 5 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 34 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 35; un anticuerpo comparativo 6 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 36 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 37; un anticuerpo comparativo 7 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 38 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 39; un anticuerpo comparativo 8 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 40 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 41; un anticuerpo comparativo 9 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 42 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 43; un anticuerpo comparativo 10 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 44 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 45; y un anticuerpo comparativo 11 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 46 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 47. Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm<sup>2</sup> a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml en 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían los respectivos anticuerpos monoclonales, comparativos quiméricos de humano-ratón 1 a 11.

#### 45 Ejemplo 9 Preparación de anticuerpo monoclonal quimérico humano-de pollo

Sobre la base del anticuerpo monoclonal de pollo n.º 1 obtenido en el Ejemplo 3, se preparó una línea celular que producía de forma estable un anticuerpo quimérico humano-de pollo n.º 1 que tenía las regiones variables del anticuerpo monoclonal de pollo n.º 1 de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 4 (2) del documento WO2011/096519 sobre la base de. La línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150-cm<sup>2</sup> a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml en 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener un sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo quimérico de humano-pollo n.º 1.

55 Además, sobre la base de los anticuerpos monoclonales de pollo n.º 2, n.º 3 y n.º 4, también se prepararon líneas celulares que producían de forma estable un anticuerpo quimérico de humano-pollo n.º 2, n.º 3 o n.º 4 usando la misma estrategia que anteriormente. Cada línea celular preparada se usó para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían el anticuerpo quimérico de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 o n.º 4.

60 Ejemplo 10 Análisis de la expresión de CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas usando anticuerpos monoclonales de ratón N.º 1, n.º 2 y n.º 3 y anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4.

A continuación, 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 celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), las líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las líneas celulares cáncer de páncreas (Capan-2 y MIAPaCa-2), la línea celular

de cáncer de próstata (PC3), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las líneas celulares de tumores cerebrales (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), las líneas celulares de cáncer gástrico (MNK28 y MNK45), las líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116), la línea celular de leucemia (AML5) y la línea celular de linfoma (Ramos), que se había observado que

5 tenían expresión del gen de CAPRIN-1, se examinaron con respecto a su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie de las células usando los sobrenadantes del cultivo que contenían, respectivamente, los anticuerpos monoclonales n.º 1, n.º 2 y n.º 3 obtenidos en el ejemplo 2 y los anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 obtenidos en el ejemplo 3. Se centrifugaron  $10^6$  células de cada línea celular cada una en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Cada sobrenadante de cultivo (100  $\mu$ l) que contenía cualquiera de los anticuerpos n.º

10 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 se añadió al tubo y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavar con PBS, los anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (H + L) marcados con FITC (fabricados por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) se diluyeron con PBS que contenía FBS al 0,1 % para los anticuerpos derivados de ratones o anticuerpos de cabra marcados con FITC, Inc.) diluidos 100 veces con FBS que contenía PBS al 0,1 % para los anticuerpos derivados de pollo y se dejaron reposar a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo utilizado fue células que han reaccionado solo con anticuerpos secundarios. Como resultado, todas las células tratadas con cualquiera de los anticuerpos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales de pollo n.º 1 a n.º 4 tenían una intensidad de fluorescencia de al menos un 35 % más fuerte que la del control negativo. Esto demostró que las proteínas CAPRIN-1 se expresan en la superficie de la

20 membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. Las velocidades de mejora en la intensidad de fluorescencia se expresaron como las velocidades de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en las líneas celulares respectivas, que se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula.

Velocidad de incremento de la intensidad de fluorescencia media (velocidad de mejora de la intensidad de fluorescencia) (%) =  $((\text{MFI de las células reaccionadas con los anticuerpos anti-CAPRIN-1}) - (\text{MFI Control})) / (\text{MFI Control}) \times 100$

25

Ejemplo 11 Actividad antitumoral contra las células cancerosas del anticuerpo frente al péptido derivado de CAPRIN-1 (SEQ ID NO: 5)

30

Con el fin de evaluarlos anticuerpos contra el péptido derivado de CAPRIN-1 (SEQ ID NO: 5) para determinar la resistencia de su citotoxicidad frente a las células cancerosas que expresan CAPRIN-1, se determinó la actividad de ADCC. En esta evaluación se utilizaron los anticuerpos policlonales (preparados en el Ejemplo 5) contra el péptido mostrado en la SEQ ID NO: 5. Se realizó una evaluación similar usando anticuerpos policlonales contra otros péptidos derivados de CAPRIN-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos 50 a 98 en la secuencia de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos 233 a 305 en la secuencia de aminoácidos de la CAPRIN-1 humana, que se prepararon en el Ejemplo 5) como anticuerpos para comparación o los anticuerpos de control derivados de suero de conejo preparados en el Ejemplo 5 como control negativo.

35

Se recogieron  $10^6$  células de la línea celular cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y de la línea celular de cáncer de pulmón QG56 que se observó que tenían expresión de CAPRIN-1 cada una en un tubo de centrífuga de 50 ml y, a continuación, se añadieron al mismo 100  $\mu$ Ci de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía 10 % de suero de ternera fetal y se añadieron a  $2 \times 10^3$  células/pocillo a una placa de fondo en V de 96 pocillos. Los anticuerpos policlonales contra el péptido derivado de CAPRIN-1 humana (SEQ ID NO: 5) y dos tipos de anticuerpos policlonales contra otros péptidos derivados de CAPRIN-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos 50 a 98 de CAPRIN-1 humana y anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos 233 a 305 de CAPRIN-1 humana se añadieron cada uno a 1  $\mu$ g/pocillo. Los linfocitos separados de la sangre periférica humana de acuerdo con un método convencional se añadieron adicionalmente a los mismos a  $4 \times 10^5$  células/pocillo y se cultivaron durante 4 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo (Cr) 51 liberado de las células cancerosas dañadas en el sobrenadante de cultivo para calcular la actividad ADCC contra las células cancerosas debido a los anticuerpos policlonales contra los péptidos derivados de CAPRIN-1 humana. Como resultado, todos los anticuerpos policlonales obtenidos mediante inmunización con los péptidos parciales de CAPRIN-1 humana que tienen la secuencia de aminoácidos de los restos de aminoácidos 50 a 98 o los restos de aminoácidos 233-305 de CAPRIN-1 humana tuvieron una actividad inferior al 10 % frente a la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2, y la a línea celular de

40

45

50

55

60

65

cáncer de pulmón humano QG56. Por el contrario, los grupos de las células tratadas con los anticuerpos policlonales contra el péptido derivado de CAPRIN-1 humana (SEQ ID NO: 5) exhibieron una actividad citotóxica de 25 % o más contra todas las líneas celulares de cáncer. Los anticuerpos de control negativo tuvieron una actividad inferior al 4 % frente a todas las células cancerosas. Estos resultados revelaron que los anticuerpos contra CAPRIN-1 mostrados en la SEQ ID NO: 5 ejercen una fuerte actividad citotóxica contra las células cancerosas que expresan CAPRIN-1.

Estos resultados se obtuvieron mediante la determinación de la actividad citotóxica mediante, como se ha descrito

antes, la mezcla del anticuerpo de CAPRIN-1 usado en la presente invención, los linfocitos y  $2 \times 10^3$  Células de cada línea celular de cáncer con cromo 51 incorporado, cultivo de las células durante 4 horas; después del cultivo, medir la cantidad de cromo 51 liberada en el medio; y calcular la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente fórmula\*.

5 \*Expresión: Actividad citotóxica (%) = [Cantidad de cromo 51 liberado por las células diana tratadas con el anticuerpo contra la CAPRIN-1 y linfocitos]/Cantidad de cromo 51 liberado por las células diana tratadas con ácido clorhídrico 1N] x 100

10 Se evaluaron los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos n.º 1, n.º 2 y n.º 3 obtenidos en el ejemplo 8 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 obtenidos en el Ejemplo 9 para determinar su actividad citotóxica contra las células cancerosas humanas. Se purificó el sobrenadante del cultivo de cada línea celular que producía cualquiera de los n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 usando itrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Bio-  
15 Sciences Ltd.). Después del reemplazo con PBS(-), se filtró la solución a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se usó para un ensayo de actividad. Se recogieron  $10^6$  células de la línea celular cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y de la línea celular de cáncer de pulmón QG56 que se en un tubo de centrífuga de 50 ml y, a continuación, se añadieron al mismo 100 µCi de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía 10 % de FBS y se añadieron a  $2 \times 10^3$  células/pocillo a una placa de fondo en V de 96 pocillos para preparar las células diana. Se evaluaron los anticuerpos purificados (anticuerpos monoclonales, quiméricos de humano-ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 ) y los anticuerpos monoclonales quiméricos de pollo humano comparativos 1 a 11 # obtenidos en el  
25 ejemplo 8 se añadieron cada uno a los mismos a 1,3 µg/pocillo. Se separó una población de células que contenía células NK humanas utilizando un método convencional de linfocitos de sangre periférica humana preparados de acuerdo con un método convencional. La población celular que contiene células NK humanas que se usó en esta evaluación se preparó como sigue: las células mononucleares de sangre periférica humana separadas usando una solución de separación por densidad Histopaque para la separación de células mononucleares de sangre periférica (Sigma-Aldrich Corp.) se hicieron reaccionar con anticuerpos marcados con el colorante fluorescente FITC (anticuerpo anti-CD3 humano, anticuerpo anti-CD20 humano, anticuerpo anti-CD19 humano, anticuerpo anti-CD11c humano o anticuerpo anti-HLA-DR (Becton, and Dickinson and Company)); y se separó una población celular que contenía células NK sin teñir con los anticuerpos utilizando un clasificador de células (FACS Vantage SE (Becton, and Dickinson and Company)) o se separó una población de células con un kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec KK). La población celular separada que contenía células NK se añadió a la placa a  $2 \times 10^5$  células/pocillo y se cultivaron durante 4 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberada de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 contra las células cancerosas. El control negativo utilizado fue células tratadas con anticuerpos de control de isotipo. Como resultado, Los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos de humano - ratón 1 a 11 tuvieron actividad citotóxica de menos de 5 % frente a MCF7, menos de 3 % frente a HCT-116, 7 % frente a MIAPaCa-2, menos de 8 % contra Caki-2 y menos de 5 % contra QG56. Por el contrario, el anticuerpo monoclonal quimérico de humano-ratón n.º 1 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1 a n.º 4 tenían actividad citotóxica de 30 % o más frente a MCF7, 19 % o más frente a HCT-116, 28 % o más frente a MIAPaCa-2, 34 % o más frente a Caki-2, y 10 % o más frente a QG56. Además, los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-ratón n.º 2 y n.º 3 tenían actividad citotóxica de 32 % o más frente a MCF7, 18 % o más frente a HCT-116, 32% o más frente a MIAPaCa-2, 18 % o más frente a Caki-2 y 10 % o más frente a QG56. De forma análoga, los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos comparativos 1 a 11 utilizados tenían actividad citotóxica inferior al 4 % frente a todas las otras 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 colorrectal SW480, una línea celular de leucemia AML5 y una línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, Se observó que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 10 % o mayor contra estas líneas celulares. Estos resultados mostraron que los anticuerpos monoclonales n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 contra las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 a través de su actividad ADCC y se demostró que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3 y los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 exhiben una actividad citotóxica más fuerte frente a las células cancerosas humanas contra la de los anticuerpos comparativos 1 a 11

Además, los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 se evaluaron de la misma manera que anteriormente para determinar su actividad citotóxica contra la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-436, la línea celular de cáncer el riñón humano Caki-1, la línea celular de cáncer de pulmón humano A549, la línea celular de cáncer de páncreas humano Panc-1 y las células de cáncer colorrectal humano

DLD-1 que se observó que tenían expresión del gen de CAPRIN-1. Adicionalmente, los anticuerpos quiméricos de humano - pollo n.º 1 y n.º 2 contra CAPRIN-1 descritos en el Ejemplo 4 del documento WO2011/096517 se usaron como anticuerpos comparativos 12 y 13, respectivamente; los anticuerpos quiméricos de humano - pollo n.º 1 contra CAPRIN-1 descritos en el Ejemplo 4 del documento WO2011/096519 se usaron como anticuerpos comparativos 13; anticuerpos quiméricos de humano-pollo n.º 1 y anticuerpos monoclonales de ratón n.º 2, n.º 3, n.º 4, n.º 5, y n.º 6 contra CAPRIN-1 descritos en el Ejemplo 4 del documento WO2011/096528 se usaron como anticuerpos comparativos 14, 15, 16, 17, 18 y 19, respectivamente; los anticuerpos monoclonales de ratón n.º 1, n.º 2, y n.º 3 contra CAPRIN-1 descritos en el Ejemplo 3 del documento WO2011/096533 se usaron como anticuerpos comparativos 20, 21 y 22, respectivamente; y los anticuerpos monoclonales de ratón n.º 1, n.º 2, y n.º 3 contra CAPRIN-1 descritos en el Ejemplo 3 del documento WO2011/096534 se usaron como anticuerpos comparativos 23, 24 y 25, respectivamente, para la evaluación de la actividad citotóxica. Específicamente, se recogieron  $10^6$  células de la línea celular de cáncer colorrectal humano DLD-1 en un tubo de centrífuga de 50 ml y, a continuación, se añadieron al mismo 100  $\mu$ Ci de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 1 hora. A continuación, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía 10 % de FBS y se añadieron a  $2 \times 10^3$  células/pocillo a una placa de fondo en V de 96 pocillos para preparar las células diana. A continuación, los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1 a n.º 4 y los anticuerpos comparativos 12 a 25 se añadieron cada uno a 1  $\mu$ g/pocillo. Una población celular que contenía las células NK humanas preparada de acuerdo con un método convencional se añadió adicionalmente a los mismos a  $10^5$  células/pocillo y se cultivaron durante 4 horas a 37 °C, CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberada 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. También se evaluó la citotoxicidad contra MDA-MB-436, Caki-1, A549 y Panc-1 de la misma forma que se ha indicado anteriormente. Como resultado, todos los anticuerpos comparativos 12 a 25 tenían actividad citotóxica del 5% o menor frente a MDA-MB-436, mientras que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 18 % o mayor contra esta línea celular. Todos los anticuerpos comparativos 12 a 25 tenían actividad citotóxica del 5% o menor frente a Caki-1, mientras que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 14% o mayor contra esta línea celular. Todos los anticuerpos comparativos 12 a 25 tenían actividad citotóxica del 5 % o menor frente a A549, mientras que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 12% o mayor contra esta línea celular. Todos los anticuerpos comparativos 12 a 25 tenían actividad citotóxica del 5 % o menor frente a Panc-1, mientras que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 18 % o mayor contra esta línea celular. Todos los anticuerpos comparativos 12 a 25 tenían actividad citotóxica del 7 % o menor frente a DLD-1, mientras que los anticuerpos monoclonales quiméricos de humano-pollo n.º 1, n.º 2, n.º 3 y n.º 4 tenían una actividad citotóxica del 15% o mayor contra esta línea celular.

Estos resultados se obtuvieron mediante la determinación de la actividad citotóxica mediante, como se ha descrito antes, mezclando el anticuerpo anti-CAPRIN-1 usado en la presente invención, los linfocitos (población celular que contiene células NK) y  $2 \times 10^3$  células de cada línea celular de cáncer con cromo 51 incorporado; cultivando las células durante 4 horas; después del cultivo, midiendo la cantidad de cromo 51 liberada en el medio; y calculando la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente fórmula\*.

\*Expresión: Actividad citotóxica (%) = [Cantidad de cromo 51 liberado por las células diana tratadas con el anticuerpo contra la CAPRIN-1 y linfocitos (población celular que contiene células NK)]/[Cantidad de cromo 51 liberado por las células diana tratadas con ácido clorhídrico 1N] x 100

Ejemplo 12 Número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-1 N.º 1, n.º 2 y n.º 3.

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 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), las líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las líneas celulares de cáncer de páncreas (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), las líneas celulares de tumores cerebrales (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), las líneas celulares de cáncer gástrico (MKN28 y MKN45), las líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116), una línea celular de leucemia (AML5) y una línea celular de linfoma (Ramos) usando un kit de ensayo para el número de moléculas "QIFIKIT" (fabricado por Dako Japan Inc.) para determinar el número de moléculas de CAPRIN-1 en su superficie celular reconocidas por los anticuerpos monoclonales de ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3 obtenidos en el ejemplo 2. De manera similar, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de estas diversas células cancerosas también se examinó usando los anticuerpos monoclonales comparativos 1 a 11.

Específicamente, de acuerdo con el protocolo adjunto al kit, cada anticuerpo (anticuerpos monoclonales de ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3, y los anticuerpos comparativos 1 a 11) se diluyó en 5  $\mu$ g/ml a una concentración final con PBS y esta dilución se añadió a cada línea celular y se hizo reaccionar durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, los anticuerpos IgG anti-ratón marcados fluorescentemente unidos al kit se añadieron como anticuerpos secundarios, junto con perlas de calibración unidas al kit, a cada línea celular y se dejaron reposar durante 45 minutos en hielo.

Cada línea celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. Después, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson y Company) para obtener un valor medio de la intensidad de fluorescencia (media) para todos los anticuerpos descritos anteriormente. El control negativo utilizado fue células que reaccionaron con los anticuerpos de control de isotipo y también se obtuvo una media. Cada valor de intensidad de fluorescencia media (media) se utilizó para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas reconocidas por los anticuerpos monoclonales de ratón n.º 1, n.º 2 y n.º 3 fue  $10^5$  o más por célula para todas las líneas celulares de cáncer humano examinadas. Por otra parte, el número de moléculas reconocidas por los anticuerpos comparativos 1 a 11 fue inferior a  $10^5$  por célula.

10 Aplicabilidad industrial

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

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

20 <120> Composición farmacéutica para el tratamiento y prevención del cáncer

<130> PH-5299-PCT

<150> JP 2011-171300

25 <151> 04-08-2011

<160>81

<170> PatentIn versión 3.1

30 <210> 1

<211> 5562

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35 <220>

<221> CDS

<222> (190)..(2319)

<223>

40 <400> 1

ES 2 634 249 T3

cagagggctg ctggctggct aagtcocctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc	120
ggaagggacc gccacccttg cccocctcage tgcccactcg tgatttccag 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	

ES 2 634 249 T3

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



ES 2 634 249 T3

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

ES 2 634 249 T3

gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609  
ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc cttcccttag atgcataggg 3669  
agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729  
ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789  
tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849  
taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattctt 3909  
ccagtaggtg ctcagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969  
tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctgttgaac attccacatt 4029  
caaaagtttt gtaggggtgg gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089  
aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtgttac atcatattgg aagggttaac 4149  
ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgcgtg ctttaaatga 4209  
catctgcctg ggatgtacca caaccatatg ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat 4269  
atgtgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329  
atgtgtatc tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc 4389  
ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449  
gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaaggtgt tcatagtttg 4509  
actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaaactat aatttttctt 4569  
tttttggtta ttttaccatc acagtttaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629  
tatttttaaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689  
ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749  
ccttttgttt ggtcaaagtc atatttttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809  
tcaactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869  
taaataatct catgtggata tgaaacttct tttttaaaac ttaaaaagggt agaatgttat 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 gaaggttcat taactgaggt 5169  
gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttccctaagt ttttaggaca tttgttcatt 5229  
atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289  
tcattttatg ttttaagctcc tgaatctgca ttccacttg gttgttttta agcattctaa 5349  
attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgcccttgat cttgtccttt 5409  
ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469  
tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaaagact agtgaatggt 5529  
taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

ES 2 634 249 T3

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

5 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 634 249 T3

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

ES 2 634 249 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					

ES 2 634 249 T3

**Thr Gln Gln Val Asn**  
**705**

<210> 3  
<211> 3553  
5 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*  
  
<220>  
<221> CDS  
10 <222> (190)..(2274)  
<223>  
  
<400> 3

ES 2 634 249 T3

cagagggctg ctggctggct aagtcocctcc cgctcccggc tctcgcctca ctaggagcgg	60
ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgcccc cggagcgcgc gacactgccc	120
ggaagggacc gccacccttg cccocctcagc tgcccactcg tgatttccag 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 2 634 249 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 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 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
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 2 634 249 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	ggt	ggc	act	tac	cat		1911
Thr	Glu	Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His		
	560					565					570						
ggt	tcc	cca	gac	cag	tcc	cat	caa	gtg	act	ggt	aac	cac	cag	cag	cct		1959
Gly	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	His	Gln	Val	Thr	Gly	Asn	His	Gln	Gln	Pro		
575					580					585					590		
cct	cag	cag	aac	act	gga	ttt	cca	cgt	agc	aat	cag	ccc	tat	tac	aat		2007
Pro	Gln	Gln	Asn	Thr	Gly	Phe	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Asn		
				595					600					605			
agt	cgt	ggt	gtg	tct	cgt	gga	ggc	tcc	cgt	ggt	gct	aga	ggc	ttg	atg		2055
Ser	Arg	Gly	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Met		
			610					615					620				
aat	gga	tac	cgg	ggc	cct	gcc	aat	gga	ttc	aga	gga	gga	tat	gat	ggt		2103
Asn	Gly	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly		
		625				630						635					
tac	cgc	cct	tca	ttc	tct	aac	act	cca	aac	agt	ggt	tat	aca	cag	tct		2151
Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ser		
	640					645					650						
cag	ttc	agt	gct	ccc	cgg	gat	tac	tct	ggc	tat	caa	cgg	gat	gga	tat		2199
Gln	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Arg	Asp	Gly	Tyr		
655					660					665					670		





ES 2 634 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 634 249 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> 18  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr  
 1 5 10 15

10 Leu Lys  
 <210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 6

ES 2 634 249 T3

Ser Tyr Gly Met Ser  
1 5

5 <210> 7  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 7

10 Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala  
1 5 10

<210> 8  
<211> 11  
<212> PRT  
15 <213> *Mus musculus*  
  
<400> 8

20 Leu Ala Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
1 5 10

<210> 9  
<211> 110  
<212> PRT  
25 <213> *Mus musculus*  
  
<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

30 <210> 10  
<211> 15

ES 2 634 249 T3

<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 10

5

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

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

10

<400> 11

Gly Ala Ser Ser Leu Glu Asp  
1 5

15

<210> 12  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

20

<400> 12

Leu Gln His Ser Tyr Leu Pro Pro Leu Thr Phe  
1 5 10

25

<210> 13  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

30

<400> 13

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

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

Thr Ser Ile Asn Leu Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Leu Glu Asp Gly Val Pro Ser  
50 55 60

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

Ser Leu Glu Asp Glu Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln His Ser

ES 2 634 249 T3

85

90

95

Tyr Leu Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105 110

Arg

<210> 14  
 <211> 330  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 14

gggggaggct tagtgaagcc tggagggtcc ctgaaactct cctgtgcagc ctctggattc 60  
 actttcagta gctatggcat gtcttgggtt cgcagactc cggagaagag gctggagtgg 120  
 gtcgcaacca ttagtagtgg tggtagttac acctactatc cagacagtgt gaagggtcga 180  
 ttcaccatct ccagagacaa tgccaagaac acctgtacc tgcaaatgag cagtctgagg 240  
 tctgaggaca cggccatgta ttactgtgca agcctggcct cctactactt tgactactgg 300  
 ggccaaggca ccactctcac agtctctca 330

10

<210> 15  
 <211> 339  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

15

<400> 15

ggtgccagat gtgatgtcca gatgattcag totocatoc tccctgtctgc atctttggga 60  
 gacatagtca ccatgacttg ccaggcaagt cagggcacta gcattaattt aaactggttt 120  
 cagcaaaaac cagggaagc tcctaagctc ctgatctatg gtgcaagcag cttggaagat 180  
 ggggtcccat caaggttcag tggcagttgt tttgggacag atttactct caccatcagc 240  
 agcctggagg atgaagatat ggcaacttat ttctgtctac agcatagtta tctcctccg 300  
 ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacgt 339

20

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

25

<400> 16

Thr Tyr Asp Leu His  
 1 5

30

<210> 17  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

ES 2 634 249 T3

<400> 17

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

5 <210> 18  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 18

Asn Tyr Gly Tyr Ser Ala Trp Phe Ala Tyr Trp  
 1 5 10

15 <210> 19  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 19

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

Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Asp Leu His Trp Val Arg Gln  
 20 25 30

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

Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile Ser Arg Leu Ser Ile Ser Lys  
 50 55 60

Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala  
 65 70 75 80

Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg Asn Tyr Gly Tyr Ser Ala  
 85 90 95

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 100 105 110

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

<400> 20

Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn  
 1 5 10 15

30

ES 2 634 249 T3

<210> 21  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5  
 <400> 21

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser  
 1 5

<210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10  
 <400> 22  
 15

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 23  
 <211> 118  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20  
 <400> 23

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

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

Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln  
 35 40 45

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

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

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr  
 85 90 95

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

Lys Leu Glu Leu Lys Arg  
 115

25  
 <210> 24  
 <211> 333  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

30

ES 2 634 249 T3

<400> 24

```

ggacctggcc tagtgcagcc ctcacagagc ctgtccatca cctgcacagt ctctggtttc      60
tcattgacta cctatgattt acaactgggtt cgccagtctc caggaaaggg tctggagtgg      120
ctgggagtga tatggagtgg tggaaqcaca gactataatg cagctttcat atccagactg      180
agcatcagca aggacaattc caagagccaa gttttcttta aaatgaacag tctgcaagct      240
aatgacacag ccatatatta ctgtgccaga aactacgget actccgctg gtttgettac      300
tggggccaag ggactctggt cactgtctct gca                                     333

```

5 <210> 25  
 <211> 354  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 25

```

cctgcttcca gcagtgatgt tttgatgacc caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt      60
ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagca ttgtacatag taatggaaac      120
acctatttag aatggtacct gcagaaacca ggccagtctc caaagctcct gatctacaaa      180
gtttccaacc gattttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggatc agggacagat      240
ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttatta ctgctttcaa      300
ggttcacatg ttccgctcac gttcgggtgct gggaccaagc tggagctgaa acgt          354

```

15 <210> 26  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20 <400> 26

ES 2 634 249 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> 27  
 <211> 139  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 27

ES 2 634 249 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> 28

<211> 148

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 28

ES 2 634 249 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> 29

<211> 132

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 29

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

10

ES 2 634 249 T3

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

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> 30  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5

<400> 30

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

10

ES 2 634 249 T3

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> 31  
 <211> 117  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 31

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

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Gln Ser Asp  
 115

10  
 <210> 32  
 <211> 148  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 32

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

ES 2 634 249 T3

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> 33  
 <211> 94  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 33

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

ES 2 634 249 T3

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

<210> 34  
 <211> 148  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 34

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> 35  
 <211> 105  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*  
 <400> 35

ES 2 634 249 T3

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

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

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

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

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

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

Val Gln Val Pro Arg Arg Arg Ser Asn  
 100 105

- <210> 36
- <211> 100
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 36

ES 2 634 249 T3

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Lys  
 100

<210> 37

<211> 90

5 <212> PRT

<213> *Mus musculus*

<400> 37

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> 38

<211> 116

<212> PRT

15 <213> *Mus musculus*

ES 2 634 249 T3

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Asn  
 115

5 <210> 39  
 <211> 100  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 39

ES 2 634 249 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> 40  
 <211> 108  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 40

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

ES 2 634 249 T3

<210> 41  
 <211> 104  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 41

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> 42  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 42

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

ES 2 634 249 T3

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

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> 43  
 <211> 94  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 43

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

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

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

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

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

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

10  
 <210> 44  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

<400> 44

ES 2 634 249 T3

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

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

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

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

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

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

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

- <210> 45
- <211> 102
- 5 <212> PRT
- <213> *Mus musculus*
- <400> 45

ES 2 634 249 T3

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

<210> 46  
 <211> 101  
 5 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 46

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

ES 2 634 249 T3

<210> 47  
 <211> 99  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

5 <400> 47

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

10 <210> 48  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 48

ES 2 634 249 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

ES 2 634 249 T3

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> 49  
 <211> 106  
 5 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 49

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

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

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

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

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

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

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

10  
 <210> 50  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 15 <213> *Mus musculus*

ES 2 634 249 T3

<400> 50

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

5

<210>51  
 <211>7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 51

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser  
 1 5

15

<210> 52  
 <211>9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 52

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr  
 1 5

25

<210> 53  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

30

<400> 53

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

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

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

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

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

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

Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu

ES 2 634 249 T3

100

105

110

Ile Lys Arg  
115

5 <210> 54  
<211> 345  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 54

ggggtcattg tgatgtcaca gtctccatcc tccctagctg tgtcacttgg agagaagggt 60  
actatgagct gcaagtccag tcagagcctt ttatatagta gcaatcaaaa gaactacttg 120  
gcctgggtacc agcagaaacc agggcagctc cctaaactgc tgatttactg ggcattccact 180  
aggggaatctg ggggtccctga tcgcttcaca ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc 240  
accatcagca gtgtgaaggc tgaagacctg gcagtttatt actgtcagca atattatagc 300  
10 tatccattca cgttcggctc ggggacaaaag ttggaaataa aacgt 345

15 <210> 55  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
<400> 55

His Ser Met Phe  
1

20 <210> 56  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
25 <400> 56

Gly Ile Tyr Gly Val Gly Arg Ser Ile Arg Tyr Gly Ser Ala Val Lys  
1 5 10 15

Gly

30 <210> 57  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
35 <400> 57

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

Ile Asp Ala Trp  
20

ES 2 634 249 T3

<210> 58  
 <211> 127  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

5 <400> 58

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

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
 20 25 30

Ser Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Tyr Gly Val Gly Arg Ser Ile Arg Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

Tyr Phe Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser  
 115 120 125

10 <210> 59  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

15 <400> 59

Ser Gly Gly Tyr Ser Asn Tyr Gly  
 1 5

20 <210> 60  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*

25 <400> 60

Tyr Asn Asp Lys Arg Pro Ser  
 1 5

<210> 61  
 <211> 12

ES 2 634 249 T3

<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*

<400> 61

5

Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Thr Asp Ala Gly Ile Phe  
1 5 10

<210> 62  
<211> 103  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*

10

<400> 62

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

Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Asn Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln  
20 25 30

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

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser  
50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu Asp Glu Ala Val  
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Thr Asp Ala Gly Ile Phe Gly  
85 90 95

Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val  
100

15

<210> 63  
<211> 127  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*

20

<400> 63

ES 2 634 249 T3

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

Ala Leu Ser Leu Val Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser His  
 20 25 30

Ser Met Phe Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Tyr Gly Val Gly Arg Ser Ile Arg Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60

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

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

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

Tyr Phe Ile Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser  
 115 120 125

<210> 64

<211> 7

5 <212> PRT

<213> *Gallus gallus*

<400> 64

Glu Asn Asp Lys Arg Pro Ser  
 1 5

10

<210> 65

<211> 103

<212> PRT

15 <213> *Gallus gallus*

<400> 65

ES 2 634 249 T3

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

Glu Ile Thr Cys Ser Gly Gly Tyr Ser Asn Tyr Gly Trp Tyr Gln Gln  
 20 25 30

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

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser  
 50 55 60

Thr Gly Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Arg Ala Glu Asp Glu Ala Val  
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Gly Gly Tyr Asp Ser Ser Thr Asp Ala Gly Ile Phe Gly  
 85 90 95

Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val  
 100

<210> 66  
 <211> 4  
 5 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 66

Phe Gly Met Phe  
 10 1

<210> 67  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 15 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 67

Ser Ile Ser Asp Asn Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Val Lys  
 1 5 10 15

Gly  
 20 <210> 68  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 25 <400> 68

ES 2 634 249 T3

Asn Ala Tyr Val Gly Arg Gly Cys Cys Phe Ser Tyr Ser Ile Asp Ala  
 1 5 10 15

Trp

<210> 69  
 <211> 124  
 5 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 69

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

Gly Leu Ser Leu Val Cys Lys Gly Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
 20 25 30

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

Ala Ser Ile Ser Asp Asn Gly Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Ser Ala Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Ser Arg Asp Asp Gly Gln Ser Thr Val Arg  
 65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Thr Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Lys Asn Ala Tyr Val Gly Arg Gly Cys Cys Phe Ser Tyr Ser Ile  
 100 105 110

10 Asp Ala Trp Gly His Gly Thr Glu Val Ile Val Ser  
 115 120

<210> 70  
 <211> 11  
 15 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 <400> 70

Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asp Ala Tyr Gly  
 1 5 10

20 <210>71  
 <211>7  
 <212> PRT  
 <213> *Gallus gallus*  
 25 <400> 71

ES 2 634 249 T3

Asn Gly Ser Asn Arg Pro Ser  
1 5

5 <210> 72  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
<400> 72

10 Gly Ser Thr Asp Thr Ser Thr Ser Val Gly Ile Phe  
1 5 10

15 <210> 73  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
<400> 73

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Gly Gly Ser Ser Ser Asp Ala Tyr Gly Trp  
20 25 30

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

Gly Ser Asn Arg Pro Ser His Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Thr  
50 55 60

Ser Gly Ser Thr Asn Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Val Glu Asp  
65 70 75 80

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

Ile Phe Gly Ala Gly Thr Thr Leu Thr Val  
100 105

20 <210> 74  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
25 <400> 74

Tyr Gly Met Gly  
1

30 <210> 75  
<211> 16  
<212> PRT

ES 2 634 249 T3

<213> *Gallus gallus*

<400> 75

5 Ala Ile Arg Lys Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Gly Pro Ala Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

10 <213> *Gallus gallus*

<400> 76

15 Arg Ser His Thr Gly Val Asn Ala Ala Lys Ile Asp Ala Trp  
1 5 10

<210> 77

<211> 120

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

20

<400> 77

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

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

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

Ala Ala Ile Arg Lys Asp Gly Ser Thr Asn Tyr Gly Pro Ala Val Lys  
50 55 60

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

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

Lys Arg Ser His Thr Gly Val Asn Ala Ala Lys Ile Asp Ala Trp Gly  
100 105 110

Arg Gly Thr Glu Val Ile Val Ser  
115 120

25 <210> 78

<211> 8

<212> PRT

<213> *Gallus gallus*

30 <400> 78

ES 2 634 249 T3

Ser Gly Ala Ser His Asn Tyr Gly  
1 5

<210> 79  
<211> 7  
5 <212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
  
<400> 79

Ser Asn Asp Lys Arg Pro Ser  
1 5

10  
  
<210> 80  
<211> 10  
<212> PRT  
15 <213> *Gallus gallus*  
  
<400> 80

Gly Gly Tyr Asn Ile Tyr Gly Pro Thr Phe  
1 5 10

20  
<210> 81  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> *Gallus gallus*  
25  
  
<400> 81

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

Lys Ile Thr Cys Ser Gly Ala Ser His Asn Tyr Gly Trp Phe Gln Gln  
20 25 30

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

Arg Pro Ser Asp Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Ser  
50 55 60

Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Asp Asp Glu Ala Val  
65 70 75 80

Tyr Phe Cys Gly Gly Tyr Asn Ile Tyr Gly Pro Thr Phe Gly Ala Gly  
85 90 95

Thr Thr Leu Thr Val  
100

30

## REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con un polipéptido parcial de CAPRIN-1 que consiste en la secuencia de aminoácidos mostrada por la SEQ ID NO: 5.
2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo tienen actividad citotóxica contra una célula cancerosa que expresa una proteína CAPRIN-1.
3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.
5. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
6. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
7. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 16, 17 y 18 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 20, 21 y 22 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
8. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 6, 7 y 8 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 50, 51 y 52 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
9. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 59, 60 y 61 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
10. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 55, 56 y 57 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 59, 64 y 61 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
11. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 66, 67 y 68 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 70, 71 y 72 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
12. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o 5, que comprenden una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 74, 75 y 76 y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 78, 79 y 80 y que tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRIN-1.
13. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.
14. 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 de prevención del cáncer.

15. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
- 5
16. Una composición farmacéutica que, como principio activo, comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 para su uso en un método de tratamiento y/o
- 10 de prevención del cáncer.
18. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago,
- 15 leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
19. Una combinación farmacéutica que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
- 20
20. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19 para su uso en un método de tratamiento y/o de prevención del cáncer.
21. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico,
- 25 cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
22. Un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.