

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 241**

51 Int. Cl.:

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013** **PCT/JP2013/054403**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013** **WO13125654**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013** **E 13752353 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017** **EP 2818483**

54 Título: **Composición medicinal para tratar y/o prevenir el cáncer**

30 Prioridad:

21.02.2012 JP 2012035238

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2017

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;
SAITO, TAKANORI;
IDO, TAKAYOSHI y
MINAMIDA, YOSHITAKA

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 643 241 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 medicinal para tratar y/o prevenir el cáncer

5 Campo de la técnica

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

10 Técnica antecedente

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

Para reducir las reacciones adversas de la terapia del cáncer, se desea que los péptidos, polipéptido, o proteínas que se reconocen como antígenos del cáncer deberían existir raramente en células normales y existan específicamente en células cancerosas. En 1991, Boon et al. (Ludwig Institute for Cancer Research, Bélgica) aisló un antígeno del melanoma humano MAGE1 que era reconocido por las células T positivas a CD8 mediante un método de clonación por expresión de ADNc utilizando líneas celulares cancerosas autólogas y células T reactivas al cáncer (Bibliografía no Patente 2). Después, se había informado de un método SEREX (identificación serológica de antígenos por clonación de expresión recombinante), que adoptaba una estrategia de clonación de la expresión genética para identificar antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos producidas en respuestas a un cáncer autólogo in vivo en un paciente con cáncer (Bibliografía no Patente 3 y Bibliografía de Patente 1). De acuerdo con este método, se habían aislado algunos antígenos que se expresan raramente en células normales y se expresan específicamente en el cáncer (Bibliografía no Patente 4 a 9). Además, utilizando una parte del antígeno del cáncer como diana, hay un ensayo clínico que se dirige a algunos de los antígenos del cáncer aislados, con una terapia celular que utiliza inmunocitos que reaccionan específicamente con los antígenos del cáncer o inmunoterapia específica del cáncer utilizando vacunas o similares que comprenden antígenos del cáncer.

En los últimos años, han aparecido en el mundo distintos fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer que se dirigen a las proteínas antigénicas de las células cancerosas. Estos fármacos han llamado la atención debido a su cierta eficacia como agentes terapéuticos específicos del cáncer. Sin embargo, una gran mayoría de las proteínas antigénicas a las que se dirige el fármaco, también se expresan en células normales. Como resultado de la administración de los anticuerpos, se dañan las células normales que expresan los antígenos así como las células cancerosas, dando como resultado reacciones adversas desventajosamente. Por lo tanto, si se pueden identificar los antígenos del cáncer que se expresan específicamente en la superficie de las células cancerosas y se pueden utilizar como fármacos los anticuerpos dirigidos a los antígenos, se puede esperar que estos fármacos de anticuerpos consigan un tratamiento con menos reacciones adversas.

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

La bibliografía de Patente 3 desvela anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen actividad anticáncer y es la fuente de alguno de los anticuerpos comparativos utilizados en los ejemplos del presente documento.

55 Listado de referencias

Bibliografía de Patente

Bibliografía de Patente 1: Patente de EE. UU. N° 5698396

Bibliografía de Patente 2: Patente WO2010/016526

Bibliografía de Patente 3: Patente WO2011/096517

Bibliografía no Patente

Bibliografía no Patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, Vol. 24, p. 55-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)

Bibliografía no Patente 2: Bruggen P. et al., Science, 254: 1643-1647 (1991)
 Bibliografía no Patente 3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11810-11813 (1995)
 Bibliografía no Patente 4: Int. J. Cancer, 72: 965-971 (1997)
 Bibliografía no Patente 5: Cancer Res., 58: 1034-1041 (1998)
 5 Bibliografía no Patente 6: Int. J. Cancer, 29: 652-658 (1998)
 Bibliografía no Patente 7: Int. J. Oncol., 14: 703-708 (1999)
 Bibliografía no Patente 8: Cancer Res., 56: 4766-4772 (1996)
 Bibliografía no Patente 9: Hum. Mol. Genet 6: 33-39, 1997

10 Sumario de la invención

Problema técnico

15 Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo que se dirige a la CAPRINA-1 que se expresa específicamente en la superficie de células cancerosas y sea superior en su actividad antitumoral a los anticuerpos convencionales, y proporcionar el uso de los mismos como un agente terapéutico y/o preventivo para el cáncer.

Solución del problema

20 Las características de la presente invención son las siguientes:

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con un polipéptido de CAPRINA-1 parcial que tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5, y una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención el cáncer, que comprende el anticuerpo o un
 25 fragmento del mismo como principio activo.

En una realización, el cáncer es un cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, cáncer cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

30 En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, o un anticuerpo multiespecífico (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico).

35 Efectos ventajosos de la invención

El anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención daña con más fuerza las células cancerosas que los anticuerpos convencionales contra CAPRINA-1. Por lo tanto, el anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo
 40 con la presente invención es útil en el tratamiento o prevención del cáncer.

Descripción de las realizaciones

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

El anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda ejercer una actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, anticuerpos recombinantes (por ejemplo, anticuerpos
 55 sintéticos, anticuerpo multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos de cadena sencilla (scFv)), anticuerpos humanos, y sus fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂, y Fv). Estos anticuerpos y los fragmentos de los mismos se pueden preparar por métodos conocidos en general por los expertos en la técnica. Deseablemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene reactividad inmunológico con una proteína CAPRINA-1 o un polipéptido parcial de la
 60 misma, es decir, se une a (preferentemente, se une específicamente a) la proteína CAPRINA-1 mediante una reacción antígeno-anticuerpo. En este contexto, la frase "que se une específicamente a la proteína CAPRINA-1" significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRINA-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente un anticuerpo monoclonal y sin embargo, puede ser un anticuerpo policlonal siempre que se produzcan anticuerpos homogéneos establemente. En
 65 el caso de un sujeto de ensayo humano, es deseable un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir las reacciones adversas.

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

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

De aquí en adelante, la presente invención se describirá con más detalle.

< Preparación del antígeno para la preparación de anticuerpos >

Las proteínas o un fragmentos de las mismas que se utilizan como antígenos sensibilizantes para obtener el anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención no se limitan por las especies animales que sirven como origen, incluyendo seres humanos, perros, gatos, ganado bovino, caballos, ratones, ratas y pollos. Las proteínas o los fragmentos de las mismas, sin embargo, se seleccionan preferentemente en vista de la compatibilidad con las células parentales para su uso en la fusión celular. En general se prefieren las proteínas derivadas de mamíferos. Particularmente, se prefieren las proteínas derivadas de seres humanos. Por ejemplo, cuando la CAPRINA-1 es CAPRINA-1 humana, se pueden utilizar proteínas de CAPRINA-1 humana, péptidos parciales de la misma, o células que expresan CAPRINA-1 humana.

Las secuencias de nucleótido y las secuencias de aminoácidos de la CAPRINA-1 humana y los homólogos de la misma se pueden obtener, por ejemplo, haciendo un acceso a GenBank (NCBI, EE. UU.) y utilizando un algoritmo tal como BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993; y Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997).

En la presente invención, en referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 o 3) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 o 4) de la CAPRINA-1 humana, la diana CAPRINA-1 es un ácido nucleico o una proteína que consiste en una secuencia que tiene un 70 % a un 100 %, preferentemente un 80 % a un 100 %, o un 99,5 % a un 100 %, más preferentemente un 95 % a un 100 %, por ejemplo, un 97 % a un 100 %, un 98 % a un 100 %, un 99 % a un 100 %, o un 99,5 % a un 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de la ORF o la parte madura de la referencia (la secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 que comparadas se diferencian en los restos de aminoácidos en la posición 690 y siguientes). En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos respecto al número total (incluyendo el número de huecos) de aminoácidos (o bases) cuando se alinean dos secuencias de manera que se alcance el máximo grado de similitud o identidad con o sin la introducción de huecos.

Un fragmento que comprende un epítipo (o un determinante antigénico), que es la mínima unidad reconocida por el anticuerpo, y que tenga una longitud que varía desde la longitud de aminoácidos del epítipo a menos de la longitud completa de la proteína CAPRINA-1 se puede utilizar como un fragmento de proteína CAPRINA-1. El epítipo se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad mínima consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, por ejemplo 8 a 11 aminoácidos. El fragmento de proteína CAPRINA-1 para su uso en la preparación del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente un fragmento que es reconocido por el anticuerpo de la presente invención y comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 (que se corresponde con una secuencia desde la posición 429 a 444 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4) o una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o mayor, preferentemente un 85 % o mayor, más preferentemente un 90 % o mayor, más preferentemente un 95 % o mayor de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o comprende al menos un epítipo que consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo 8 a 11 aminoácidos consecutivos en cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

Las proteínas de CAPRINA-1 humana y los fragmentos polipeptídicos que comprenden péptidos parciales de las mismas se pueden sintetizar de acuerdo con métodos de síntesis química, por ejemplo, los métodos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) ((Seikagaku Jikken Koza (Curso de Experimentación Bioquímica en inglés) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). También, estos polipéptidos se pueden sintetizar por métodos de rutina utilizando distintos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado.

De manera alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar utilizando estrategias de modificación genéticas conocidas en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, the 2^a edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, the 3^a edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) y que se incorporan en vectores de expresión, que se introducen entonces en células huésped de manera que las células huésped producen los polipéptidos. De esta manera, se pueden obtener las

proteínas de CAPRINA-1 humana de interés o los fragmentos polipeptídicos de la misma.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar fácilmente por estrategias de modificación genética conocidas en la técnica o métodos de rutina utilizando sintetizadores de ácidos nucleico disponibles en el mercado. Por ejemplo, se puede preparar un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de un gen de CAPRINA-1 humana mediante PCR utilizando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como matriz y un par de cebadores diseñados para que sean capaces de amplificar la secuencia de nucleótidos. Las condiciones de reacción para esta PCR se pueden determinar apropiadamente. Ejemplos de las condiciones pueden incluir, pero sin limitarse a, 30 ciclos que implican cada uno las etapas de reacción de 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos a 1 minuto (hibridación), y 72 °C durante 2 minutos (elongación) utilizando una ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa o Pfu polimerasa) y un tampón de PCR que contenga Mg^{2+} , seguido por una reacción a 72 °C durante 7 minutos. La estrategia de PCR, condiciones, etc. se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, la 3ª edición, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (particularmente, Capítulo 15).

También, se pueden preparar sondas apropiadas basándose en la información sobre las secuencias de nucleótidos de los genes de CAPRINA-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRINA-1, y utilizarse para la exploración, por ejemplo, en 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 CAPRINA-1. Ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos derivados de cánceres o tumores tales como testicular, leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma. Estas operaciones, incluyendo la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración en la biblioteca de ADNc, y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning*, la 2ª edición, *Current Protocols in Molecular Biology* (1989), y Ausubel et al. (*supra*). Los ADN que codifican las proteínas CAPRINA-1 humana y los péptidos parciales de las mismas se pueden obtener a partir del ADN así obtenido.

Las células huésped que reciben los vectores de expresión pueden ser cualquiera de las células capaces de expresar los polipéptidos anteriores. Ejemplos de células procariotas incluyen, pero no se limitan a. *E. coli*. Ejemplos de células eucariotas incluyen, pero no se limitan a: células de mamífero tales como células de riñón de mono COS1, células ováricas de hámster chino CHO, una línea celular de riñón embrionario humano HEK293, una línea celular de piel embrionaria de ratón NIH3T3, células de levadura tales como células de levadura en crecimiento y células de levadura en fisión, células de gusano de seda, y células de huevos de *Xenopus*.

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

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

Los vectores de expresión se pueden introducir en las células huésped utilizando métodos conocidos tales como electroporación, un método de fosfato cálcico, un método de liposomas, un método de DEAE dextrano, microinyección, infección vírica, lipofección y unión con péptidos penetrantes celulares.

El polipéptido de interés se puede aislar y purificar a partir de las células huésped por una combinación de operaciones de separación conocidas en la técnica. Ejemplos de las mismas incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con un desnaturalizante (por ejemplo, urea) o un tensioactivo, ultrasonificación, digestión enzimática, desalación, fraccionamiento y precipitación en disolvente, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de enfoque isoeléctrico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba,

cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.

Los antígenos preparados de esta manera se pueden utilizar como antígenos sensibilizantes como se describe posteriormente para la producción de anticuerpos de acuerdo con la presente invención.

< Estructura del anticuerpo >

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) habitualmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprende cada una al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas, excepto IgM, son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa cada una compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente único, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas varía entre los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesada y ligera tiene también un enlace disulfuro intracatenario. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido por una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (región VL) en un extremo y tiene una única región constante en el otro extremo. La región constante de 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 llamadas regiones determinantes de complementariedad (CDR) de los dominios variables de anticuerpo presentan una variabilidad específica y hacen posible la especificidad de unión del anticuerpo. Las partes conservadas relativamente en las regiones variables se llaman regiones marco conservadas (FR). Los dominios variables completos de cadena pesada y ligera comprende cada uno cuatro FR conectados por medio de tres CDR. Estas res CDR se llaman CDRH1, CDRH2, y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la cadena pesada. De igual manera, las CDR se llaman CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR de cada cadena se mantienen cercanas entre ellas por las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión al antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR de la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión anticuerpo-antígeno pero presentan distintas funciones efectoras, por ejemplo, la implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), la fagocitosis mediada por la unión con un receptor Fc γ , la semivida/velocidad de aclaramiento mediada por un receptor Fc neonatal, y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediado por un componente C1q de la cascada del complemento.

< Preparación del anticuerpo >

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención significa un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1 de longitud completa o un fragmento de la misma. Particularmente, el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención es un anticuerpo que se une inmunológicamente a un polipéptido parcial de una proteína CAPRINA-1 (polipéptido parcial de CAPRINA-1) que es un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo que se muestra en SEQ ID NO: 5. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención reconoce un epítipo que consiste aproximadamente en 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, 8 a 11 aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5. Este anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención es capaz de unirse específicamente a la proteína CAPRINA-1 de longitud completa. El anticuerpo de la presente invención se puede obtener seleccionando un anticuerpo unido inmunológicamente al polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5. De acuerdo con un método de rutina de entre los anticuerpos que se obtienen con las proteínas CAPRINA-1 o un fragmentos de las mismas como antígenos.

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo para unirse al antígeno CAPRINA-1 (proteína CAPRINA-1 de longitud completa o un polipéptido parcial de la misma) in vivo. Mediante dicha unión a la CAPRINA-1, el anticuerpo de la presente invención ejerce la función de dañar (por ejemplo, destruir, suprimir o regresar) las células tumorales. El anticuerpo de la presente invención puede perjudicar un tumor, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso (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 esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma mediante la unión con la proteína CAPRINA-1.

El anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo. Ejemplos de los tipos de anticuerpo de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). También, el anticuerpo es cualquier clase de molécula de inmunoglobulina, por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgA, IgD, o IgY, o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, o IgA2.

El anticuerpo se puede modificar adicionalmente por acetilación, formulación, amidación, fosforilación, PEGilación o similares, además de la glicosilación.

De aquí en adelante se mostrarán los ejemplos de preparación de distintos anticuerpos.

Quando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se administra una línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 que expresa CAPRINA-1 a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de los ratones. Tras la separación de las células esplénicas, las células se fusionan con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de las células del cáncer se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridoma). De manera alternativa, se pueden seleccionar los clones que producen anticuerpo se unen a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de células cancerosas o los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra el péptido de SEQ ID NO: 5 o similares se aíslan y cultivan. El anticuerpo de la presente invención se puede preparar por purificación del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un método de purificación por afinidad general.

Los hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal se puede preparar, por ejemplo, de la siguiente manera: en primer lugar, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización en general implica la inyección por vía intraperitoneal o subcutánea de los antígenos sensibilizantes a mamíferos. Específicamente los antígenos sensibilizantes se diluyen o suspenden en PBS (solución salina tampón de fosfato), solución salina fisiológica, o similares en una cantidad apropiada y después se mezclan, si se desea, con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante completo de Freund. Tras la emulsión, la emulsión resultante se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 21 días. De manera alternativa, se puede utilizar un vehículo apropiado para la inmunización con antígenos sensibilizantes.

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

Las células de mieloma de mamífero se utilizan como células parentales auxiliares que se van a fusionar con los inmunocitos. Se conocen distintas líneas celulares en la técnica, por ejemplo, se utilizan preferentemente 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), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133), 240E-1 y 240E-W como células de mieloma.

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

Más específicamente, se lleva a cabo la fusión celular, por ejemplo, en presencia de un promotor de fusión celular en un medio nutritivo convencional. Por ejemplo, se utiliza el polietilenglicol (PEG) o el virus sendai (HVJ) como el promotor de fusión. Si fuera necesario, se puede añadir adicionalmente un auxiliar tal como dimetil sulfoxido para su uso con el fin de aumentar la eficacia de fusión.

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

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

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

Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, los hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (por ejemplo, actividad inhibidora del crecimiento celular) se pueden obtener por sensibilización de linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas in vitro y fusionar los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas de seres humanos capaces de dividirse

permanentemente, por ejemplo, U266 (Nº de registro TIB 196).

Los hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal preparados de esta manera se pueden subcultivar en un medio convencional y también se pueden almacenar durante un largo periodo en nitrógeno líquido.

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

Otro ejemplo del anticuerpo que se puede utilizar en la presente invención es un anticuerpo policlonal. El anticuerpo policlonal se puede obtener por ejemplo, de la siguiente manera:

Se obtiene el suero de pequeños animales tales como ratones, ratones que producen anticuerpos humanos, o conejos inmunizados con proteínas CAPRINA-1 naturales o proteínas CAPRINA-1 recombinantes que se expresan como proteínas de fusión con GST o similares en microorganismos tales como E. coli, o los péptidos parciales de las mismas. De manera alternativa, el suero se puede obtener de mamíferos inmunizados con fragmentos de CAPRINA-1 que funcionan como antígenos sensibilizantes, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en 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, más preferentemente un 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácido (preferentemente, un polipéptido que consiste en cualquiera de estas secuencias de aminoácidos), o un polipéptido que comprende un epítipo (preferentemente, que consiste en el epítipo) que consisten aproximadamente en 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos de la secuencias de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 o la secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o más, preferentemente un 85 % o más, más preferentemente un 90 % o más, más preferentemente un 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos. El suero así obtenido se puede purificar utilizando, por ejemplo, precipitación en sulfato amónico, columnas de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico DEAE, o columnas de afinidad acopladas con proteínas CAPRINA-1 o péptidos sintéticos para preparar anticuerpos policlonales anti-CAPRINA-1. El anticuerpo policlonal de la presente invención incluye los anticuerpos obtenidos a partir de animales que producen anticuerpos humanos (por ejemplo ratones) inmunizados con proteínas CAPRINA-1.

En este contexto, por ejemplo, se conocen los ratones KM (Kirin Pharma Co., Ltd. /Medarex) y ratones Xeno (Amgen Inc.) como los ratones productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, en las Publicaciones Internacionales Nº WO02/43478 y WO02/092812). Se pueden obtener anticuerpos policlonales humanos completos de la sangre de dichos ratones por inmunización con proteínas CAPRINA-1 o un fragmento de las mismas. De manera alternativa se pueden aislar las células esplénicas de los ratones así inmunizados y fusionarlas con células de mieloma. De esta manera, se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos.

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

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo recombinante genéticamente que se produce utilizando una técnica de recombinación genética que implica: clonar un gen del anticuerpo a partir de hibridomas; incorporar el gen de anticuerpo en vectores apropiados; 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, los ADNc de la región variable (región V) del anticuerpo se sintetizan a partir de los ARNm de los hibridomas utilizando una transcriptasa inversa. Tras la obtención de los ADN que codifican las regiones V de interés, se ligan los ADN con los ADN que codifican las regiones constantes (regiones C) de anticuerpo deseadas. Los productos de la unión resultantes se incorporan en vectores de expresión. De manera alternativa, los ADN que codifican la región V de anticuerpo se pueden incorporar en vectores de expresión que contienen los ADN de la región C de anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión de manera que se expresen bajo el control de expresión de regiones de control, por ejemplo, un amplificador y un promotor. Después, se pueden transformar las células huésped con los vectores de expresión resultantes y se permite que se expresen los anticuerpos.

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

El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, conejo, y pollo), y anticuerpos monoclonales

quiméricos. El anticuerpo monoclonal se puede preparar por el cultivo de hibridomas obtenidos por la fusión entre células esplénicas de mamíferos no humanos (por ejemplo, ratones, ratones productores de anticuerpos humanos, pollos, o conejos) inmunizados con proteínas CAPRINA-1 o un fragmentos de las mismas y células de mieloma. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo que se prepara por la combinación de secuencias derivadas de diferentes animales y es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto de las regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo de ratón y las regiones constantes de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano. El anticuerpo se puede preparar utilizando un método conocido en la técnica que implica, por ejemplo, unir los ADN que codifican las regiones V de anticuerpo de ratón con los ADN que codifican las regiones C de anticuerpo humano; incorporando los productos de la unión resultantes en vectores de expresión; e introduciendo los vectores en huéspedes de manera que se produzcan los anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales que tienen reactividad inmunológica con el polipéptido parcial de CAPRINA-1 que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 y tiene efecto antitumoral se preparan por un método que se describe posteriormente en los Ejemplos.

El anticuerpo humanizado, también llamado anticuerpo humano reformado, es un anticuerpo modificado. El anticuerpo humanizado se construye injertando regiones determinantes de complementariedad de anticuerpo humano con CDR de anticuerpo derivadas de un animal inmunizado. Por lo tanto también se conoce una estrategia general de recombinación genética.

Específicamente, las secuencias de ADN diseñadas para unirse con, por ejemplo, las CDR de anticuerpos de ratón, conejo o pollo, y las regiones marco conservadas humanas (FR) se sintetizan por PCR utilizando varios oligonucleótidos preparados que tienen partes terminales solapadas entre ellas. Los ADN obtenidos se unen con ADN que codifican regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de unión resultantes se incorporan en vectores de expresión que se introducen entonces en huéspedes para la producción de anticuerpo para obtener el anticuerpo de interés (véase la Publicación de Solicitud de Patente europea N° EP239400 y la Publicación Internacional N° WO96/02576).

Las FR de anticuerpo humano conectadas mediante las CDR se seleccionan de manera que las regiones determinantes de complementariedad formen un sitio de unión al antígeno favorable. Si fuera necesario, los aminoácidos de las regiones marco conservadas de las regiones variables de anticuerpo se pueden sustituir de manera que las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante forme un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Además, estas FR se pueden sustituir con regiones marco conservadas de anticuerpos humanos de clases o subclases diferentes de las mismas (véase la Publicación Internacional N° WO99/51743).

Los aminoácidos de las regiones variables (por ejemplo, las FR) o las regiones constantes del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado preparado de esta manera se pueden sustituir, 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 1 a 5 aminoácidos, más preferentemente 1 o 2 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debería ser funcionalmente equivalente a un anticuerpo no sustituido. La sustitución será una sustitución de aminoácidos deseablemente conservadora, que es la sustitución entre aminoácidos con propiedades similares tales como la carga, cadenas laterales, polaridad, y aromaticidad. Los aminoácidos se pueden clasificar en términos de propiedades similares por ejemplo, en: aminoácidos básicos (arginina, lisina, e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína, y tirosina); aminoácidos no polares (leucina, isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina); aminoácidos ramificados (leucina, valina, e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano, e histidina).

Ejemplos de aminoácidos modificados pueden incluir anticuerpos unidos con distintas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). En el anticuerpo modificado de la presente invención, la sustancia que se va a unir no está limitada. Con el fin de obtener dicho anticuerpo modificado, el anticuerpo modificado se puede modificar químicamente. Por lo tanto ya se ha establecido un método en la técnica.

En este contexto, la frase "funcionalmente equivalente" significa que el anticuerpo a que se hace referencia tiene una actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente el anticuerpo al que se hace referencia tiene la función de dañar un tumor y no produce esencialmente reacciones adversas cuando se aplica en seres humanos, por ejemplo. Ejemplos de dicha actividad puede incluir la actividad inhibidora del crecimiento y actividad de unión.

Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a cierto polipéptido, que implica la introducción de una mutación en un polipéptido, es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden introducir apropiadamente una mutación en el anticuerpo de la presente invención utilizando la mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. et al., (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ., y Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. et al., (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer, W. y Fritz,

HJ., (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) o similares, preparando de esta manera un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

- 5 El anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRINA-1 o un fragmento polipeptídico de CAPRINA-1 que comprende el epítipo, se puede obtener por un método en general conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede obtener por un método que implica la determinación del epítipo de la proteína CAPRINA-1 reconocido por el anticuerpo anti-CAPRINA-1 obtenido que tiene un efecto inhibidor del crecimiento celular mediante un método convencional (por ejemplo, mapeo de epítipo o un método de identificación de epítopos
10 que se describe posteriormente) y la preparación de un anticuerpo utilizando un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo como inmunógeno, o un método que implica determinar un epítipo para un anticuerpo preparado por un método convencional y seleccionar un anticuerpo que reconozca el mismo epítipo que el del anticuerpo anti-CAPRINA-1. En este contexto, el "epítipo" se refiere a un fragmento de polipéptido que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad mínima consiste en
15 aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, preferentemente 8 a 11 aminoácidos.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con la CAPRINA-1, un anticuerpo que reconoce específicamente la CAPRINA-1, o un anticuerpo que se une específicamente a la CAPRINA-1 y presenta actividad citotóxica contra el cáncer o un efecto inhibidor del crecimiento tumoral. El anticuerpo preferentemente es un anticuerpo que tiene una estructura que produce poca o ninguna reacción adversa en los animales receptores. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos humanos-de ratón), anticuerpos de cadena sencilla, y anticuerpos biespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano o tienen regiones variables de cadenas pesada y ligera con regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) derivadas
20 de un anticuerpo de un animal no humano y regiones marco conservadas (FR1, FR2, FR3, y FR4) derivadas de un anticuerpo humano. De manera alternativa, estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo de un animal no humano y regiones constantes de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano. El anticuerpo de la presente invención es
25 preferentemente los dos primeros anticuerpos.

Dichos anticuerpos recombinantes se pueden preparar de la siguiente manera: los ADN que codifican anticuerpo monoclonales (por ejemplo anticuerpos monoclonales humanos, de ratón, de conejo y de pollo) contra la CAPRINA-1 humana se clonan de células productoras de anticuerpo tales como hibridomas y se utilizan como matrices en una RT-PCR o similar para preparar los ADN que codifican las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos. Las secuencias respectivas de las regiones variables de las cadenas ligera y pesada, las secuencias respectivas de CDR1, CDR2, y CDR3 de cada región, o las secuencias respectivas de FR1, FR2, FR3, y FR4 de cada región se pueden determinar basándose por ejemplo en el sistema de numeración de Kabat EU (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª Ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)).
30

Dicho ADN que codifica cada región variable o ADN que codifica cada CDR se prepara utilizando una técnica de recombinación genética (Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. En este contexto, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar inmunizando animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) con CAPRINA-1 humana y luego fusionando las células esplénicas extraídas de los animales inmunizados con células de mieloma. Junto con esto, se preparan los ADN que codifican las regiones variables y constantes de cadena ligera y pesada humanas, si fuera necesario, utilizando una técnica de recombinación genética o un sintetizador de ADN.
35

Para el anticuerpo humanizado, el ADN que codifica el anticuerpo humanizado se puede preparar sustituyendo las secuencias que codifican las CDR de los ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano por las secuencias codificantes de las CDR correspondientes derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo).
40

Para el anticuerpo quimérico, los ADN que codifican las regiones variables de cadenas ligera o pesada derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, o pollo) se puede unir con los ADN que codifican las regiones constantes de cadena ligera o pesada derivados de un anticuerpo humano para preparar un ADN que codifique el anticuerpo quimérico.
45

El anticuerpo de cadena sencilla se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena ligera y pesada unidas linealmente entre ellas mediante un enlazador. Se puede preparar un ADN que codifica el anticuerpo de cadena sencilla uniendo un ADN que codifica la región variable de cadena pesada, un ADN que codifica el enlazador, y un ADN que codifica la región variable de cadena ligera. En este contexto, las regiones variables de cadenas pesada y ligera se derivan ambas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que tiene solo las CDR sustituidas por CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata,
50
55
60
65

conejo, o pollo). El enlazador consiste en 12 a 19 aminoácidos. Ejemplos del mismo incluyen el (G₄S)₃ que consiste en 15 aminoácidos (G.B. Kim et al., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

El anticuerpo biespecífico (por ejemplo, un diacuerpo) se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dos epítopos diferentes. Se puede preparar un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico uniendo, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada A, un ADN que codifica una región variable de cadena ligera B, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada B y una región variable de cadena ligera A en este orden (siempre que el ADN que codifica una región variable de cadena ligera B y el ADN que codifica la región variable de cadena pesada B se unan mediante un ADN que codifica un enlazador como se describe anteriormente). En este contexto, las regiones variables de cadena pesada y ligera se derivan todas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano que tiene solo las CDR sustituidas por CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, o pollo).

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

Ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparado por cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluyen los siguientes anticuerpos (a) a (i):

- (a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 8, 9 y 10 y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 11, 12 y 13;
- (b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 8, 9 y 14 y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 11, 12, y 13;
- (c) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 54;
- (d) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 18;
- (e) un anticuerpo que consiste en una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 23;
- (f) una anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 23;
- (g) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 26, 27, y 28 y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 30, 31, y 32 (por ejemplo, un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 33);
- (h) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 36, 37, y 38 y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (por ejemplo, un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43); y
- (i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 46, 47, y 48 y una región variable de cadena que comprende las regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (por ejemplo, un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 49 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43).

En este contexto, las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9 y 10 se corresponden con las CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la región variable de cadena pesada de un anticuerpo derivado de conejo. Las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 11, 12, y 13 se corresponden con las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo derivado de conejo. La secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 14 se corresponde con la CDR3 de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo derivado de conejo.

También, las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 26, 27, y 28, SEQ ID NO: 36, 37, y 38, o SEQ ID NO: 46, 47, y 48 se corresponden con las CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo derivada de un anticuerpo de ratón. Las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 30, 31, y 32 o SEQ ID NO: 40, 41, y 42 se corresponden con la CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo derivado de ratón.

Ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo de cadena sencilla, o el anticuerpo

biespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos (I) a (II), por ejemplo, en la forma de (b):

- (I) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 14, respectivamente, regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humanizado o las secuencias de aminoácidos con partes de las mismas sustituidas y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13, respectivamente, regiones marco conservadas de un anticuerpo humano o secuencias de aminoácidos con partes de las mismas sustituidas; y
- (II) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16 y una región constante de cadena pesada derivada de un anticuerpo humano, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región constante de cadena ligera derivada de un anticuerpo humano.

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

Preferentemente, estos anticuerpos tienen una actividad citotóxica y por eso pueden ejercer un efecto antitumoral.

Las secuencias particulares anteriores de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR de cada anticuerpo se proporcionan simplemente con el fin de ilustración. Es obvio que el anticuerpo de la presente invención no se limita por las secuencias particulares. Los hibridomas capaces de producir anticuerpos humanos anti-CAPRINA-1 humana o anticuerpo de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos de ratón) diferentes de los descritos anteriormente, se preparan, y los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se recuperan y evalúan según se valore que sean (o no sean) los anticuerpos de interés con su actividad de unión inmunológica contra la CAPRINA-1 humana y la actividad citotóxica como índices. Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de interés se identifican de esta manera. Luego, se producen los ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera de los anticuerpos de interés a partir de los hibridomas y se secuencian, como se ha descrito anteriormente. Los ADN se utilizan para la preparación de los diferentes anticuerpos.

Cada uno de los anticuerpos anteriores pueden tener la sustitución, eliminación o adición de uno o varios aminoácidos, particularmente en la secuencia de la región marco conservada y/o la secuencia de la región constante, siempre que el anticuerpo tenga dicha especificidad que pueda reconocer la CAPRINA-1. En este contexto, el término "varios" significa preferentemente 2 a 5, más preferentemente 2 o 3.

La constante de afinidad K_a (k_{on}/k_{off}) del anticuerpo de la presente invención por una proteína CAPRINA-1 o un fragmento de la misma es preferentemente al menos de $10^7 M^{-1}$, al menos de $10^8 M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos de $10^9 M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos de $10^{10} M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^{10} M^{-1}$, al menos de $10^{11} M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos de $10^{12} M^{-1}$, o al menos de $10^{13} M^{-1}$.

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

Ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfan, improsulfan, piposulfan, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, trimetilolmelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongistatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido hidrocloreuro de mecloretamina, 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, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido mifofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostanol, y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolínico, aceglatona, aldofosfamida glucósido, ácido

aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, eliptinium acetato, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbicina, razoxano, rizoxina, esquizoflan, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina

A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecan, inhibidores de la topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los mismos.

Cuando el anticuerpo se conjuga con el agente antitumoral, se puede evaluar si este anticuerpo conjugado ejerce actividad antitumoral mediante un método que implica hacer reaccionar, por ejemplo, un anticuerpo anti-CAPRINA-1 derivado de ratón, simultáneamente con un anticuerpo secundario unido al fármaco capaz de unirse a un anticuerpo de ratón, y evaluar el efecto antitumoral sobre células cancerosas humanas ex vivo. Esta evaluación se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG humana unido con saponina (Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, Inc.)).

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

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

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede unir a un radioisótopo conocido públicamente en las bibliografías, etc., tales como ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P, ¹⁷⁵Lu, ¹⁷⁶Lu, ⁸⁹Sr, ⁶⁴Cu, o ¹¹¹In (Hideo Saji, YAKUGAKU ZASSHI 128 (3) 323-332, 8 (2008), Jpn). Es deseable un radioisótopo eficaz para el tratamiento o diagnóstico de tumores. Dicho radioisótopo también se incluye en el agente antitumoral de acuerdo con la presente invención.

< Identificación del epítipo >

Como se muestra en los Ejemplos posteriores, el anticuerpo de la presente invención se une a un epítipo de la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5. Un ejemplo de un método para confirmar un epítipo para el anticuerpo de la presente invención incluye un método que implica la inmovilización de un epítipo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 en una placa y evaluar el anticuerpo en cuanto a su reactividad con este epítipo. Específicamente, se inmoviliza un epítipo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 mediante una reacción en una placa que

tiene unidos grupos funcionales aceptores de electrones mediante espaciadores tales como el oligoetilenglicol. El anticuerpo de la presente invención se puede hacer reaccionar con la placa y evaluarse en cuanto a su reactividad con el epítipo mediante la reacción con un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, marcado con peroxidasa de rábano rusticano) que se une al anticuerpo de la presente invención, es decir, se puede confirmar el epítipo al que se une el anticuerpo de la presente invención. El epítipo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 que se utiliza en la inmovilización en la placa es una secuencia que comprende en ella al menos el epítipo de la secuencia de SEQ ID NO: 5 o una parte modificada del mismo (por ejemplo, con los restos del extremo N o el extremo C modificados con varios aminoácidos arbitrarios o una proteína tal como KLH o un (poli)péptido modificado con una proteína MAP). El anticuerpo de la presente invención solo necesita unirse a cualquiera de estos (poli)péptidos.

Por otra parte, incluso el anticuerpo de la presente invención puede no reaccionar con el polipéptido de SEQ ID NO: 5, es decir, no se puede confirmar el epítipo, en el método anterior. En este caso, el anticuerpo se hace reaccionar con un antígeno en condiciones de solución que faciliten la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Después de obtener el complejo antígeno-anticuerpo por un complejo de inmunoprecipitación, se puede separar un polipéptido parcial unido con el anticuerpo y examinar su secuencia de aminoácidos para confirmar el epítipo para el anticuerpo de la presente invención. En este contexto, el antígeno, por ejemplo, es el propio polipéptido de SEQ ID NO: 5 o una parte modificada del mismo. De manera alternativa, se puede utilizar incluso una proteína CAPRINA-1 siempre que el epítipo que reacciona con el anticuerpo de la presente invención se pueda confirmar por el método anterior.

< Efecto antitumoral >

El efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRINA-1 que se utiliza en la presente invención sobre las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 parece producirse por el siguiente mecanismo: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo mediada por células efectoras (ADCC) y citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) contra las células que expresan CAPRINA-1. Sin embargo no se pretende que este mecanismo limite el alcance de la presente invención.

El efecto antitumoral basado en el mecanismo se sabe que se correlaciona con el número de moléculas diana expresadas en la superficie de las células cancerosas con las que se une el anticuerpo (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 pueden examinar utilizando un kit de ensayo existente capaz de medir el número de moléculas de superficie celular. Específicamente, el número de moléculas diana a las que se une el anticuerpo se puede determinar por: haciendo reaccionar anticuerpos primarios tales como los anticuerpos contra las moléculas diana con células cancerosas; hacer reaccionar estos con anticuerpos marcados fluorescentemente contra los anticuerpos primarios junto con perlas con un número de moléculas conocido para una curva de calibración; y midiendo la intensidad de fluorescencia media de las muestras para obtener una curva de calibración.

Por lo tanto, el anticuerpo anti-CAPRINA-1 que se utiliza en la presente invención se puede evaluar en cuanto a su actividad, como se muestra específicamente en los Ejemplos posteriores, ensayando la actividad ADCC o CDC contra las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 ex vivo o examinando el número de moléculas de CAPRINA-1 que se expresan en la superficie de las células cancerosas utilizando el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención como anticuerpo primario.

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 que se utiliza en la presente invención se une a una proteína CAPRINA-1 en las células cancerosas y presenta un efecto antitumoral mediante la actividad. Por lo tanto, el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención presumiblemente 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 comprende el anticuerpo anti-CAPRINA-1 como principio activo. El anticuerpo anti-CAPRINA-1 que se utiliza con el fin de la administración a cuerpos humanos (terapia con anticuerpo) preferentemente es un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

Un anticuerpo anti-CAPRINA-1 con mayor afinidad de unión por una proteína CAPRINA-1 en la superficie de células cancerosas ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención tiene alta afinidad de unión para la proteína CAPRINA-1 y por lo tanto puede esperarse que tenga un efecto antitumoral más fuerte. En consecuencia, el anticuerpo de la presente invención es adaptable a una composición farmacéutica que se pretende para el tratamiento y/o prevención del cáncer. Dicha alta afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención es preferentemente al menos de M^{-1} , al menos de $10^8 M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos de $10^9 M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos de $10^{10} M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^{10} M^{-1}$, al menos de $10^{11} M^{-1}$, al menos de $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos de $10^{12} M^{-1}$, o al menos de $10^{13} M^{-1}$, en términos de una constante de asociación (constante de afinidad) K_a (k_{on}/k_{off}), como se ha descrito anteriormente.

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 se une a un gran número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie de células cancerosas produce una actividad antitumoral más fuerte. Deseablemente, el número de moléculas de CAPRINA-1 en un ensayo que utiliza el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención es 10^4 o más, preferentemente 10^5 o más, por célula cancerosa a los cuales se une el anticuerpo según las expectativas del efecto antitumoral. El tumor (células cancerosas) que tienen un gran número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie celular es

particularmente preferido como cáncer para recibir el anticuerpo de la presente invención.

< Unión a las células que expresan el antígeno >

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

< Tinción inmunohistoquímica >

- 10 El anticuerpo que reconoce a la CAPRINA-1 se pueden ensayar en cuanto a su reactividad con CAPRINA -1 por un método inmunohistoquímico bien conocido por los expertos en la técnica utilizando una sección congelada fijada con acetona o paraformaldehído o una sección embebida en parafina fijada con paraformaldehído de un tejido obtenido a partir de un paciente durante la operación quirúrgica o a partir de un animal que alberga el tejido de xenoinjerto
- 15 inoculado con una línea celular que exprese CAPRINA-1 o espontáneamente o tras la transfección.

Para la tinción inmunohistoquímica, el anticuerpo reactivo con CAPRINA-1 se puede teñir por distintos métodos. Por ejemplo, el anticuerpo se puede visualizar mediante una reacción con anticuerpo de cabra anti-ratón conjugada con peroxidasa de rábano rústico., anticuerpo de cabra anti-conejo, o anticuerpo de cabra anti-pollo.

- 20 < Composición farmacéutica y método para tratar y/o prevenir el cáncer >

Una diana de la composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer de la presente invención no se limita particularmente siempre que la diana sea un cáncer (las células) que expresen el gen de CAPRINA-1.

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

- 30 El cáncer direccionado en la presente invención es un cáncer que expresa un gen que codifica una proteína CAPRINA-1 y es preferentemente un cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, un cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

- 35 Ejemplos específicos de estos cánceres incluyen pero no se limitan a, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama tipo complejo, tumor mixto mamario de la glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas, cáncer de células grandes, glioma que es el tumor de tejido neuroepitelial, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de tipo celular pequeño o medio, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transversal, cáncer de colon sigmoideo, cáncer rectal, cáncer ovárico epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromáticas, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático
- 40 invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia mucinosa-papilar intraductal, neoplasia mucinosa quística, pancreoblastoma, cistadenocarcinoma seroso, tumor pseudopapilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple tipo-1 (síndrome de Wermer), tumor de islotes celulares no funcionales, somatostatinooma, y VIPoma.
- 45

Los sujetos de ensayo receptores (pacientes) son preferentemente mamíferos, por ejemplo, mamíferos que incluyen primates, animales de compañía, animales de granja y animales deportivos y son particularmente preferentemente seres humanos, perros y gatos.

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

Se puede formular una composición aséptica para inyección de acuerdo con la práctica farmacéutica convencional utilizando un vehículo tal como agua destilada inyectable.

- 65 Ejemplos de soluciones acuosas para inyección incluyen solución salina fisiológica, soluciones isotónicas que contengan glucosa y otros adyuvantes, por ejemplo, D-sorbitol, D-manosa, D-manitol, y cloruro sódico. Estas

soluciones se pueden utilizar en combinación con un solubilizante apropiado, por ejemplo, un alcohol (específicamente etanol) o un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol, y polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 80 TM o HCO-60.

- 5 Ejemplos de soluciones oleosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones se pueden utilizar en combinación con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como solubilizante. Las soluciones pueden mezclarse adicionalmente con un tampón (por ejemplo, una solución tampón de fosfato y una solución tampón de acetato sódico), un agente de inyección (por ejemplo, hidrocloreuro de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol), y un antioxidante. Las soluciones de inyección así preparadas se cargan habitualmente en
10 ampollas apropiadas.

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

- También, se puede seleccionar apropiadamente el método de administración dependiendo de la edad, peso, sexo, síntomas, etc. de un paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contenga el anticuerpo o un polinucleótido que codifique el anticuerpo se puede seleccionar en un intervalo, por ejemplo, de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal por dosis. De manera alternativa, la dosis se puede seleccionar en un intervalo, por ejemplo de 0,001 a 100000 mg/cuerpo de un paciente, aunque la dosis no se limita necesariamente a estos valores numéricos. Aunque la dosis y el método de administración varían dependiendo del peso, edad, sexo, síntomas, etc. de un
20 paciente, los expertos en la técnica pueden seleccionar apropiadamente la dosis y el método.

- La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo se puede administrar a un sujeto de ensayo para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.
25 30

- La presente invención engloba además un método para tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende la administración de una composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente o una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral a un
35 sujeto de ensayo. El anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo se pueden administrar simultáneamente o por separado con el agente antitumoral al sujeto de ensayo. En el caso de la administración por separado estas composiciones farmacéuticas, se puede administrar uno primero o después. Los intervalos de dosificación, dosis, rutas de administración y el número de dosis pueden seleccionarlo apropiadamente un especialista. Las formas de dosificación de fármacos por separado que se van a administrar simultáneamente
40 también incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formuladas cada una mezclando el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo o el agente tumoral en una vehículo (o medio) farmacéuticamente aceptable. Las descripciones anteriores acerca de la prescripción, formulación, vías de administración, dosis, cáncer, etc. como para las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen el anticuerpo del a presente invención también se aplican a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación
45 descritas anteriormente que contienen el agente antitumoral.

- Por lo tanto, la presente invención también proporciona una combinación farmacológica para el tratamiento y/o prevención del cáncer que comprende la composición farmacéutica de la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente, y un método para tratar
50 y/o prevenir el cáncer que comprende la administración de un fármaco de combinación. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo y el agente antitumoral junto con un vehículo farmacológicamente aceptable.

- 55 < Polipéptido y ADN >

- La presente invención proporciona adicionalmente un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención o el fragmento (fragmento de unión de anticuerpo) del mismo. Dicho ADN puede ser un ADN que codifique la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo o puede ser un ADN que codifique las regiones variables de cadena pesada y/o
60 ligera del anticuerpo. Dicho ADN también puede ser un ADN que codifique cada una o una combinación de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo. Dicho ADN incluye, por ejemplo, un ADN que codifica la región variable de cadena pesada que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 14 y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13 en el caso del
65 anticuerpo (b).

Las regiones determinantes de complementariedad (CDR) codificadas por el ADN que tiene estas secuencias sirven como regiones que determinan la especificidad del anticuerpo. Las secuencias que codifican las toras regiones (es decir, regiones constantes y regiones marco conservadas) del anticuerpo por lo tanto pueden ser secuencias derivadas de otros anticuerpos. En este contexto, "otros anticuerpos" incluye también anticuerpos derivados de organismos no humanos y son preferentemente los derivados de seres humanos desde el punto de vista de reducir las reacciones adversas. Específicamente, en el ADN descrito anteriormente, las regiones que codifican cada región marco conservada y cada región constante en las cadenas pesada y ligera comprenden preferentemente secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos correspondientes derivadas de un anticuerpo humano o un derivado del mismo con una sustitución parcial de aminoácidos.

Ejemplos adicionales del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluye un ADN que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, y un ADN que codifica la región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, en el caso del anticuerpo (b). En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 16, por ejemplo, es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18, por ejemplo, es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17. Cuando dicho ADN comprende una región que codifica cada región constante de cadena pesada y ligera, esta región comprende preferentemente una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano (la secuencia de aminoácidos de cada región constante de la cadena pesada y ligera).

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

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

- (i) un polipéptido que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 52 y 54, SEQ ID NO: 16 y 18, SEQ ID NO: 21 y 23, SEQ ID NO: 25 y 23, SEQ ID NO: 29 y 33, SEQ ID NO: 39 y 43, y SEQ ID NO: 49 y 43, y un ADN que codifica el polipéptido;
- (ii) un polipéptido CDR de cadena pesada que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9, y 10, SEQ ID NO: 8, 9, y 14, SEQ ID NO: 26, 27, y 28, SEQ ID NO: 36, 37, y 38, y SEQ ID NO: 46, 47, y 48, y un ADN que codifica el polipéptido; y
- (iii) un polipéptido CDR de cadena ligera que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 11, 12, y 13, SEQ ID NO: 30, 31, y 32, y SEQ ID NO: 40, 41, y 42, y un ADN que codifican el polipéptido.

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

< Sumario de la presente invención >

Los aspectos de la presente invención descritos anteriormente se resumen a continuación.

- (1) Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tienen una reactividad inmunológica con un polipéptido parcial de CAPRINA-1 que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5.
- (2) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (1), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo tiene actividad citotóxica contra células cancerosas que expresan una proteína CAPRINA-1.
- (3) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (1) o (2), en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o anticuerpo policlonal.
- (4) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (3), en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla, o una anticuerpo multiespecífico.
- (5) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 8, 9 y 10 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 11, 12, y 13 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(6) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 8, 9, y 14 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 11, 12, y 13 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(7) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (5), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 54 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(8) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (5), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 23 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(9) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (5), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 23 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(10) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (6), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 18 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(11) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 26, 27, y 28 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 30, 31, y 32 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(12) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 36, 37, y 38 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(13) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (4), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 46, 47, y 48 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que consisten en SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(14) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (11), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 33 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(15) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (12), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(16) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con (13), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 49 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43 y tienen una reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

(17) El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (16), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.

(18) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (17) como principio activo.

(20) Una combinación farmacológica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con (18) y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.

(21) Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (16).

(22) El anticuerpo, el fragmento, la composición farmacéutica o la combinación farmacológica de acuerdo con uno cualquiera de (1) a (20), para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer, en donde el cáncer es opcionalmente cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

Ejemplos

De aquí en adelante, la presente invención se describirá más específicamente en referencia a Ejemplos. Sin embargo, no se tiene la intención de que el alcance de la presente invención se limite a estos ejemplos específicos.

Ejemplo 1 Análisis de expresión de CAPRINA-1 en cada tejido

Se examinó la expresión del gen de CAPRINA-1 en tejidos caninos y humanos normales y distintas líneas celulares mediante RT-PCR de acuerdo con el Ejemplo 1 (4) del documento WO2010/016526. Como resultado, se vio una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que la expresión se vio tejidos de cáncer de mama canino, y adenocarcinomas. Como resultado de la confirmación de la expresión también en tejidos humanos, se confirmó la expresión solo en los testículos entre los tejidos normales, como con el gen de CAPRINA-1 canina. 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 pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPc-3), entre las líneas cancerosas. Estos resultados demostraban que la CAPRINA-1 se expresa en líneas celulares de cáncer de mama y líneas celulares de cáncer pancreático, aunque su expresión no se ve en tejidos normales distintos de los testículos.

Ejemplo 2 Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón contra CAPRINA-1

(1) Preparación de anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 de ratón

Se mezclaron 100 mg de una proteína CAPRINA-1 humana que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 como se prepara en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 con una cantidad igual de adyuvante MPL+TDM (fabricado por Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se utilizó como solución de antígeno para ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (fabricado por Japan SLC, Inc.). Después, se llevaron a cabo 7 refuerzos cada semana para completar la inmunización. Tres días después de la última inyección se extirpó el bazo de cada ratón y se trituró entre dos portaobjetos de cristal esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y la retirada del sobrenadante por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos se repitieron tres veces para obtener las células esplénicas. Las células esplénicas obtenidas se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas en la ATCC) a una relación de 10:1. Se calentaron 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS a 37 °C y se mezcló con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH), y la solución de PEG preparada de esta manera se añadió a la mezcla celular, que se dejó en reposo durante 5 minutos para la fusión celular. Tras retirar el sobrenadante por centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía un 15 % de FBS suplementado con un 2 % equivalente de una solución HAT (fabricada por Life Technologies, Inc. /Gibco) (Medio selectivo HAT). Esta suspensión se inoculó en quince placas de 96 pocillos (fabricadas por Thermo Fisher Scientific Inc. /Nunc) a una concentración de 100 µl/pocillo. Las células esplénicas y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones de un 5 % de CO₂ para obtener los hibridomas.

Los hibridomas se exploraron en cuanto a afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRINA-1 como índice. Se añadió una solución de 1 µg/ml de las proteínas CAPRINA-1 preparada según la estrategia descrita en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de seroalbúmina bovina (BSA) (fabricada por Sigma-Aldrich Corp.) a la misma a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó y se lavó tres veces cada pocillo con 400 µl de PBS-T. Después, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a los mismos a una concentración de 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 anti-IgG de ratón (H+L) marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) se diluyeron 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadió una solución de sustrato TMB a la misma (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para producir la reacción del color. Tras el desarrollo del color, la reacción se finalizó por la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producen anticuerpos que tenían alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana más tarde, los hibridomas que formaban colonias únicas en los pocillos se observaron. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se exploraron en cuanto a la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRINA-1 como índice. Se añadió 1 µg/ml de solución de las proteínas CAPRINA-1 preparadas mediante la estrategia descrita en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una

solución de BSA a la misma a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a la misma a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón marcado con HRP (fabricado por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadió una solución de sustrato TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) a la misma a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se finalizó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 61 líneas de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales reactivos con proteínas CAPRINA-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales se exploraron en cuanto a anticuerpo reactivos con la superficie de células de cáncer de mama humano que expresaban CAPRINA-1. Específicamente, se centrifugaron 10^6 de una línea celular MDA-MB-231V de cáncer de mama en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a la misma y se dejó en reposo durante 1 hora sobre hielo. Después del lavado con PBS, se añadieron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía un 0,1 % de FBS a la misma y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, la misma operación anterior se llevó a cabo utilizando suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad diluido 500 veces con un medio para cultivo de hibridomas en vez de los anticuerpos, para preparar un control. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal de ratón (anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1) que tenía la intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control, es decir, reaccionaba con la superficie de las células de cáncer de mama.

(2) Identificación de epítipo de CAPRINA-1 reconocido por el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1

El anticuerpo monoclonal contra CAPRINA-1 (anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1) que reacciona contra la superficie de células cancerosas que se obtiene en el párrafo (1) se utilizó para identificar una región de epítipo de CAPRINA-1 que se reconoció de esta manera. Se sintetizaron 93 péptidos candidatos que consistían cada uno en 12 a 16 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína CAPRINA-1 humana y se disolvió cada uno a una concentración de 1 mg/ml en DMSO.

Cada péptido se disolvió a una concentración de 30 µg/ml en una solución tampón de carbonato sódico 0,1 M (pH 9,6). La solución se añadió a una concentración de 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc. /Nunc, producto Nº 436006) y se dejó en reposo una noche a 4 °C. La solución de cada pocillo se desechó y se añadieron al mismo 10 mM de etanolamina/0,1 M de solución tampón de carbonato sódico (pH 9,6) a una concentración de 200 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, la solución de cada pocillo se desechó, y se lavó dos veces cada pocillo con PBS que contenía un 0,5 % de Tween 20 (PBST) para preparar una placa con el péptido inmovilizado.

El sobrenadante del cultivo celular que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 se añadió a una concentración de 50 µl/pocillo a cada placa así obtenida. Tras agitado a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución de cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con PBST. Después, se añadió al mismo una solución de anticuerpo secundario que contenía anticuerpos anti-IgG de ratón marcado con HRP (fabricado por Invitrogen Corp.) diluidos 3000 a 4000 veces con PBST a una concentración de 50 µl/pocillo. Después, la solución de cada pocillo se desechó, y se lavó cada pocillo seis veces con PBST.

Se añadió al mismo una solución de sustrato TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción.

Como resultado, el polipéptido de SEQ ID NO: 5 se identificó como una secuencia parcial de CAPRINA-1 reconocida por el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 obtenido en el Ejemplo 2 (1).

(3) Preparación de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3

De la misma manera que en el párrafo precedente (1), se mezcló una proteína de fusión de un polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 identificada en el párrafo (2) y una proteína portadora KLH (hemocianina de lapa californiana) como inmunógeno con una cantidad igual de un adyuvante TiterMax Gold (marca registrada) (CytRx Corp.), y esta mezcla se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 100 mg por inyección a cada ratón a intervalos de 7 días. Tras un total de 4 inyecciones, se obtuvieron las células esplénicas del ratón 3 días después de la última inmunización y se fusionaron con células de mieloma de ratón de la misma manera que en el párrafo (1) para preparar los hibridomas. Después, los anticuerpos contenidos en los sobrenadantes del cultivo de

los hibridomas preparados se exploraron utilizando, como índice, su reactividad con 1 µg/ml de solución de proteína CAPRINA-1 preparada como en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 y la proteína de fusión de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una proteína portadora BSA utilizada como un inmunógeno. Se añadió 1 µg/ml de solución de proteína CAPRINA-1 preparada como en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 y una proteína de fusión a 30 µg/ml de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 y una proteína portadora BSA a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadió al mismo una solución Block Ace (DS Pharma Biomedical Co., Ltd) a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó, y se lavó cada pocillo con PBS-T. Después, el sobrenadante de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió al mismo a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después se añadió al mismo anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón marcado con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadió al mismo una solución de sustrato TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo 5 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo de color, la reacción se finalizó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, los hibridomas que producían anticuerpos que tenían absorbancia alta.

Los hibridomas seleccionaron se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,3 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, se observaron las colonias que formaban colonias únicas en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente. Los hibridomas que producían anticuerpos contra la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 se obtuvieron de la misma manera que anteriormente con la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas clonados contra la secuencia parcial de CAPRINA-1 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5) como índice.

Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas obtenidos se exploraron en cuanto a anticuerpos reactivos con la superficie de células de cáncer de mama que expresaban CAPRINA-1. Específicamente, se centrifugaron 10⁶ células de una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras lavar con PBS, se añadieron anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se llevó a cabo la misma operación anterior utilizando, en vez de los anticuerpos, una muestra que contenía el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad sin tratar diluida 500 veces con un medio para el cultivo de hibridomas y una muestra que se hizo reaccionar solo con los anticuerpos secundarios como control negativo. Como resultado, se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales (anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3) que tenían una intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control negativo, es decir, reaccionaban con la superficie de células de cáncer de mama.

Los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3 se examinaron en cuanto a su reactividad específica con el polipéptido inmunogénico que tenía la secuencia parcial de CAPRINA-1 (secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5). Se añadieron una solución que contenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 ajustada a 30 µg/ml con una solución acuosa de carbonato sódico 0,1 M y una secuencia parcial de CAPRINA-1 libre de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 a una placa Inmovilizer Amino de 96 pocillos para el ELISA (Nunc/ Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µg/ml y se hizo reaccionar a 4 °C durante una noche y un día para que se unieran los péptidos a los pocillos. Se añadió a cada pocillo con péptido unido una solución acuosa de carbonato sódico 0,1 M que contenía 10 mM de etanolamina y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. La solución de cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó entonces con PBS-T. Después se añadió una solución Block Ace a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó, y se lavó cada pocillo con PBS-T. Después, se añadió el sobrenadante del cultivo que contenía los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 o nº 3 a una concentración de 50 µl/pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, cada pocillo se lavó con PBS-T. Se añadieron anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con una solución Block Ace a una concentración de 50 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó completamente con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 5 a 30 minutos para producir una reacción de color. Tras el desarrollo del color, se finalizó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3 no reaccionaban con la secuencia parcial de CAPRINA-1 libre de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. Por lo tanto, se confirmó que el polipéptido de SEQ ID NO: 5 contenía la región de epítipo para los anticuerpos monoclonales de ratón nº 2 y nº 3.

(4) Caracterización de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1, nº 2, y nº 3

Los fragmentos amplificados de los genes que codifican la región variable se obtuvieron a partir de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1, nº 2 y nº 3 que se obtuvieron en los ejemplos 2 (1) y 2 (3) y se analizaron en cuanto a sus secuencias genéticas y secuencias de aminoácidos de los mismos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526. La secuencia genética resultante que codificaba la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 se muestra en SEQ ID NO: 34, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 29. La secuencia genética que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 también se muestra en SEQ ID NO: 35, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 33. La secuencia genética resultante que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 se muestra en SEQ ID NO: 44, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 39. La secuencia genética que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 se muestra en SEQ ID NO: 45, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 43. La secuencia genética resultante que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 3 se muestra adicionalmente en SEQ ID NO: 50, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 49. La secuencia genética que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 3 se muestra en SEQ ID NO: 45, y la secuencia de aminoácidos de la misma se muestra en SEQ ID NO: 43.

Específicamente, se confirmó que el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 comprende una región variable de cadena pesada consiste en SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera consiste en SEQ ID NO: 33, en las que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 26, 27, y 28, respectivamente, y las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 30, 31, y 32, respectivamente. Se confirmó también que el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43, en las que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 36, 37, y 38, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, y 42, respectivamente. Se confirmó adicionalmente que el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 3 comprende una región variable de cadena pesada que consisten en SEQ ID NO: 49 y una región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43, en las que las CDR1, CDR2, y CDR3, de la región variable de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, 47, y 48, respectivamente, y las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, 41, y 42, respectivamente.

Ejemplo 3 Preparación de un anticuerpo policlonal contra un polipéptido parcial de CAPRINA-1 presente en la superficie de células cancerosas

Con el objetivo de obtener anticuerpos policlonales contra los polipéptidos parciales de CAPRINA-1 presentes en la superficie de las células cancerosas, un polipéptido (péptido derivado de CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5) que comprende la región del epítipo para el anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 que se obtiene en el Ejemplo 1 (1), se sintetizaron un polipéptido que tenía una región de restos de aminoácidos de número 50 a 98 en la secuencia de aminoácidos de CAPRINA-1 humana de SEQ ID NO: 2, y un polipéptido que tiene la región de restos de aminoácidos de número 233 a 305 de SEQ ID NO: 2. Se mezcló un mg de cada uno de estos péptidos como un antígeno con un volumen igual de una solución de adyuvante incompleto de Freund (IFA). Esta mezcla se administró por vía subcutánea a cada conejo cuatro veces cada dos semanas. Después, se recolectó sangre para obtener el suero que contenía cada anticuerpo policlonal. El suero se purificó adicionalmente utilizando una proteína G portadora (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.) y se sustituyó con PBS para obtener los anticuerpos policlonales contra los polipéptidos parciales de CAPRINA-1 presentes en la superficie de células cancerosas. Además, se purificó el suero de un conejo que no recibió antígeno utilizando una proteína G portadora de la misma manera que anteriormente y se utilizó como anticuerpos de control.

Ejemplo 4 Análisis de la expresión de proteína CAPRINA-1 en la superficie de la membrana de células cancerosas utilizando anticuerpos policlonales contra polipéptidos parciales de CAPRINA-1

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) de las que se había confirmado que tenían un gran nivel de expresión genética de CAPRINA-1 en cuanto a su expresión de proteínas CAPRINA-1 en la superficie celular. Se centrifugaron 5×10^5 células de cada línea celular de cáncer de mama humano confirmado de esta manera que tenían expresión genética en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 2 mg (5 μ l) de cada uno de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRINA-1 (SEQ ID NO: 5) preparados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3 y 95 μ l de PBS que contenía un 0,1 % de suero fetal bovino y se mezclaron, y se dejaron en reposo durante 1 hora en hielo. Después del lavado con PBS, la solución resultante se mezcló añadiendo 1 μ l de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa 488 (fabricados por Invitrogen Corp.) y 98 μ l de PBS que contenía un 0,1 % de suero fetal bovino (FBS) y se dejó en reposo durante 30 horas en hielo. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, se llevó a cabo la misma operación anterior utilizando los anticuerpos de control que se prepararon

como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3 en vez de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRINA-1 para preparar un control. Como resultado, las células cancerosas suplementadas con los anticuerpos anti-CAPRINA-1 todos presentaban una intensidad de fluorescencia al menos un 35 % más fuerte que la del control. Esto demostraba que las proteínas CAPRINA-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. La tasa anterior de aumento de la intensidad de fluorescencia se indicó por la tasa de aumento medio en intensidad de fluorescencia (MFI) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

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

También se midió la intensidad de fluorescencia en dos líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1 y Caki-2), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), o una línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), 2 líneas celulares de tumor cerebral (T98G y U87MG), una línea celular de cáncer gástrico (MNK28), 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1, y HCT-116), y 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPC-3) utilizando la misma estrategia anterior. Como resultado, todas las células cancerosas tenían una intensidad de fluorescencia al menos un 35 % más fuerte que la del control.

Según los resultados obtenidos anteriormente, la expresión de proteína CAPRINA-1 en la superficie de membrana de células cancerosas se confirmó también utilizando el anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5 Preparación de anticuerpo anti-CAPRINA-1 quimérico humano-de ratón

El fragmento de amplificación genética que comprende el gen de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2 se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, después se purificaron, y se insertaron de acuerdo con un método de rutina en un vector pcDNA4/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía las inserciones genéticas de una secuencia líder derivada de un anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG₁ humana que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. También se trató el fragmento de amplificación genética que comprende el gen de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 en ambos extremos con enzimas de restricción, luego se purificaron, y se insertaron de acuerdo con un método de rutina en el vector pcDNA3.1/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía las inserciones genéticas de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena L de IgG₁ humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

A continuación, el vector recombinante que tenía la inserción genética de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 y el vector recombinante que tiene la inserción genética de la región variable de cadena ligera se introdujeron en células CHO-K1 (obtenido en Riken Cell Bank). Específicamente, se cultivaron 2×10^5 células CHO-K1 en 1 ml de medio F12 de Ham (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía un 10 % de FBS por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos y se lavó con PBS (-). Después, se añadió 1 ml de un medio F12 de Ham reciente que contenía un 10 % de FBS por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores lisados en 30 µl de OptiMEM (fabricado por Invitrogen Corp.) con 30 µl de reactivo de transfección Polyfect (fabricado por Qiagen N.V.), y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 co-transfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio F12 de Ham que contenía un 10 % de FBS suplementado con 200 µg/ml de Zeocina (fabricada por Invitrogen Corp.) y 200 µg/ml de Geneticina (fabricada por Roche Diagnostics K.K.) y entonces se inocularon en una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo para preparar líneas celulares que produjeran establemente anticuerpo anti-CAPRINA-1 quimérico humano-de ratón nº 1 que tenía las regiones variables del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2. La misma operación anterior se llevó a cabo utilizando los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3 en vez de el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 para preparar líneas celulares que producían cualquiera de los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón nº 2 y nº 3 que tenían las regiones variables de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 nº 2 y nº 3, respectivamente, que se obtuvieron en el Ejemplo 2.

La línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm² a una densidad de 5×10^5 células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO libre de suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes del cultivo que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 quimérico humano de ratón nº 1. Los sobrenadantes del cultivo que contenían cualquiera de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 quiméricos humanos-de ratón nº 2 y nº 3 también se obtuvieron por la misma estrategia anterior.

También, las líneas celulares que producían establemente los anticuerpos quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 se prepararon como muestras comparativas de la misma manera que anteriormente respectivamente utilizando los siguientes anticuerpos comparativos: anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1

derivados del ratón descritos en el documento WO2010/016526 [un anticuerpo comparativo 1 que tiene una región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 26 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 27; un anticuerpo comparativo 2 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 28 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 29; un anticuerpo comparativo 3 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 30 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 31; un anticuerpo comparativo 4 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 32 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 33; un anticuerpo comparativo 5 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 34 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 35; un anticuerpo comparativo 6 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 36 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 37; un anticuerpo comparativo 7 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 38 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 39; un anticuerpo comparativo 8 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 40 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 41; un anticuerpo comparativo 9 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 42 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 43; un anticuerpo comparativo 10 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 44 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 45; y un anticuerpo comparativo 11 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 46 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096517 [un anticuerpo comparativo 12 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; y un anticuerpo comparativo 13 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096528 [un anticuerpo comparativo 14 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 15 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 51 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 55; un anticuerpo comparativo 16 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 59 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 63; un anticuerpo comparativo 17 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 80; un anticuerpo comparativo 18 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 84 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 88; y un anticuerpo comparativo 19 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 92 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 96], un anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 descrito en el documento WO2011/096519 [un anticuerpo comparativo 20 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 42 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 46], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096533 [un anticuerpo comparativo 21 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; un anticuerpo comparativo 22 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 47 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 23 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 67], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096534 [un anticuerpo comparativo 24 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 25 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 26 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 67]. Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en matraces de 150 cm² a una densidad de 5×10^5 células/ml utilizando 30 ml de medio OptiCHO libre de suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de los cultivos que contengan cualquiera de los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1-26.

Ejemplo 6 Evaluación de la expresión de CAPRINA-1 en la superficie de distintas células cancerosas utilizando un anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1

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), las 2 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1 y Caki-2), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), las 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), la línea celular de cáncer de próstata (PC3), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las 2 líneas celulares de tumor cerebral (T98G y U87MG), la línea celular de cáncer gástrico (MNK28), las 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1, y HCT-116), y las 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPC-3) de las que se había confirmado que tenían expresión genética de CAPRINA-1 en cuanto a su expresión de proteínas

CAPRINA-1 en la superficie celular utilizando el sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2. Se centrifugaron 10^6 células de cada línea celular en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Cada sobrenadante del cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo se añadió al tubo y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se añadieron los anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) de ratón marcado con FITC (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo que se utilizó eran las células que se hacían reaccionar solo con los anticuerpos secundarios. Como resultado, el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 presentaba reactividad con una intensidad de fluorescencia al menos un 30 % más fuerte que el control negativo. Los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 2 y nº 3 también producían los mismos resultados que los del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1. Además, los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2 y nº 3 preparados en el Ejemplo 5 se purificaron de acuerdo con un método de proteína utilizando una Sepharose FF Hitrap Proteína A (fabricada por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Tras la sustitución con PBS (-), cada solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Millipore Corp.) y entonces se evaluaron en cuanto a su reactividad con las líneas celulares de cáncer. Los resultados eran los mismos que los que se obtuvieron anteriormente. En la evaluación de los anticuerpos quiméricos humanos-de ratón, se utilizaron como anticuerpos secundarios, anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) humana. Esto demostraba que las proteínas CAPRINA-1 se expresaban en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cánceres humanos. La tasa anterior de aumento de intensidad de fluorescencia se indicaba por la tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

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

Ejemplo 7 Actividad antitumoral del anticuerpo anti-CAPRINA-1 contra la célula cancerosa

Con el fin de evaluar cada anticuerpo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 (SEQ ID NO: 5) en cuanto a su fuerza y su citotoxicidad contra las células que expresan CAPRINA-1, se determinó la actividad ADCC. Los anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido (SEQ ID NO: 5) preparados en el Ejemplo 3 se utilizaron en esta evaluación. Se llevó a cabo una evaluación similar utilizando anticuerpos policlonales de conejo contra otros péptidos derivados de la CAPRINA-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos de número 50 a 98 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana y anticuerpos policlonales de conejo contra los restos de aminoácidos de número 233 a 305, que se prepararon en el Ejemplo 39 como anticuerpos para compararse y los anticuerpos de control derivados del suero de conejo normal sin el tratamiento preparado en el Ejemplo 3 como control negativo.

Se recolectaron 10^6 células de cada línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 en las que se había confirmado la expresión de CAPRINA-1 en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que se añadieron entonces 100 mCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, se lavaron las células tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de suero fetal bovino y se añadieron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fondo en V. Los anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 humana (SEQ ID NO: 5) y dos tipos de anticuerpos policlonales de conejo contra otros péptidos derivados de CAPRINA-1 humana (anticuerpos policlonales de conejo contra los restos de aminoácidos números 50 a 98 de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana y anticuerpos policlonales de conejo contra los restos de aminoácidos números 233 a 305) como se ha descrito anteriormente se añadieron por separado a una concentración de 1 mg/pocillo. Los linfocitos separados de la sangre periférica de seres humanos o conejos de acuerdo con un método de rutina se añadieron posteriormente a los mismos a una densidad de 4×10^5 células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO₂. Tras el cultivo, se midió la cantidad de cromo (Cr) 51 liberado por las células cancerosas dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad ADCC contra las células cancerosas de los anticuerpos policlonales de conejo contra cada péptido derivado de CAPRINA-1 humana. Como resultado, todos los anticuerpos policlonales de conejo obtenidos por inmunización con los péptidos parciales de CAPRINA-1 humana que tenían una secuencia de aminoácidos de restos de aminoácidos número 50 a 98 o restos de aminoácidos de número 233 a 30 de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana tenían una actividad menor del 8 % contra la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56. Por el contrario, se confirmó que los grupos suplementados con los anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 humana (SEQ ID NO: 5) tenían una actividad citotóxica del 28 % o más contra todas las células cancerosas. Estos resultados demostraban que el anticuerpo contra CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 ejerce una actividad citotóxica fuerte contra las células cancerosas que expresan CAPRINA-1.

Estos resultados acerca de la actividad citotóxica se obtuvieron: mezclando el anticuerpo contra CAPRINA-1 utilizado en la presente invención, linfocitos, y 2×10^5 células de cada línea celular de cáncer con cromo 51

incorporado, como se ha descrito anteriormente: cultivar las células durante 4 horas; tras el cultivo, medir la cantidad de cromo 51 liberado en el medio; y calcular la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente expresión*:

- 5 * Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementada con anticuerpo contra CAPRINA-1 y linfocitos / Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100.

De manera similar, los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2 y nº 3 contra una
 10 secuencia parcial (SEQ ID NO: 5) de la CAPRINA-1 que se obtuvieron en el Ejemplo 5 se evaluaron en cuanto a su actividad citotóxica contra las células cancerosas humanas. El sobrenadante del cultivo de cada línea celular que producía cualquiera de los anticuerpos se purificó utilizando Sepharose FF Hitrap Proteína A (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.) de acuerdo con un método de rutina. Tras la sustitución con PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se utilizó para el ensayo
 15 de actividad. Se recolectaron 10⁶ células de cada una de línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que se añadieron entonces 100 mCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS y se añadieron a una densidad de 2 x 10³
 20 células/pocillo a cada placa de 96 pocillos de fondo en V para preparar las células diana. Los anticuerpos purificados (anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2 y nº 3) y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 obtenidos en el Ejemplo 5 se añadieron cada uno a una concentración de 0,75 mg/pocillo. Se separó una población celular que contenía células NK humanas utilizando un método de rutina a partir de linfocitos de sangre periférica humana preparados de acuerdo con un método de rutina.
 25 La población celular que contenía células NK humanas que se utilizó en esta evaluación se preparó de la siguiente manera: se hicieron reaccionar las células mononucleares de sangre periférica humana separadas utilizando una solución Histopaque de separación por gravedad específica para separación celular mononuclear en sangre periférica (Sigma-Aldrich Corp.) con anticuerpos marcados con un 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, Dickinson and Company)), y una población celular que contenía células NK sin teñir con los anticuerpos se separó como células efectoras utilizando un clasificador celular (FACS Vantage SE (Becton, Dickinson and Company)) o el kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec K.K.). La población celular separada que contenía las células NK se añadió a la placa a una densidad de 2 x 10⁵ células/pocillo y se cultivó a 37 °C durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO₂. Tras el cultivo, la cantidad de cromo
 35 41 liberado de las células tumorales dañadas se midió en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRINA-1 contra las células cancerosas. El control negativo que se utilizó eran las células suplementadas con anticuerpos de isotipo de control. Como resultado, los anticuerpos de isotipo de control que se utilizaron tenían una actividad citotóxica de menos del 5 % contra todas las líneas celulares de cáncer, y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 utilizados tenían una actividad citotóxica de menos del 5 % contra MDA-MB-231V, menos del 10 % contra DLD-1, menos del 10 % contra Capan-2, y menos del 10 % contra QG56. Por el contrario, los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2 y nº 3 tenían una actividad citotóxica del 20 % o más contra MDA-MB-231V, del 25 % o más contra DLD-1, un 35 % o más contra Capan-2, y un 30 % o más contra QG56. De la misma manera los anticuerpos de isotipo de control que se utilizaron y los anticuerpos comparativos 1 a 26 que se utilizaron tenían una actividad citotóxica menor del 4 % contra todas las otras células cancerosas, las líneas celulares de cáncer de mama T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MCF7, y MRK-nu-1, una línea celular de glioma T98G, una línea celular de cáncer de pulmón A549, una línea celular de cáncer de riñón Caki-1, una línea celular de cáncer de cuello uterino SW756, una línea celular de cáncer de vejiga urinaria T24, una línea celular de cáncer gástrico MKN28, una línea celular de cáncer de intestino grueso SW480, una línea celular de leucemia AML5, y una línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, se confirmó que los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2, y nº 3 tenían un 12 % o más de actividad citotóxica contra estas líneas celulares. Estos resultados mostraban que los anticuerpos contra el péptido derivado de CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 dañaban las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 mediante su actividad ADCC, y demostraban que los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1, nº 2, y nº 3 presentaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células cancerosas
 55 humanas que las de los anticuerpos comparativos 1 a 26.

Estos resultados acerca de la actividad citotóxica se obtuvieron: mezclando el anticuerpo contra CAPRINA-1 utilizado en la presente invención, linfocitos (población celular que contiene las células NK), y 2 x 10³ células de cada línea celular de cáncer con cromo 51 incorporado, como se ha descrito anteriormente: cultivar las células durante 4
 60 horas; tras el cultivo, medir la cantidad de cromo 51 liberado en el medio; y calcular la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente expresión*:

- 65 * Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con anticuerpo contra CAPRINA-1 y linfocitos (población celular que contiene las células NK) / Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100.

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

Se examinaron una línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231V), una línea celular de cáncer de riñón (Caki-1), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), líneas celulares de cáncer de pulmón (QC56 y A549), una línea celular de cáncer pancreático (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), una línea celular de tumor cerebral (T98G), una línea celular gástrica (MKN28), líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo y DLD-1), una línea celular de leucemia (AML5), y una línea celular de linfoma (Ramos) utilizando un kit "QIFIKIT" de número de moléculas (fabricado por Dako Japan Inc.) en cuanto al número de moléculas de CAPRINA-1 sobre su superficie celular reconocidas por los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1, nº 2 y nº 3. De manera similar, el número de CAPRINA-1 de la superficie de estas distintas células de cáncer también se examinaron utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 comparativos 1 a 26 preparados en el Ejemplo 5.

De acuerdo con el protocolo adjunto al kit, cada anticuerpo (anticuerpos anti-CAPRINA-1 nº 1 y anticuerpos comparativos 1 a 26) se diluyó en 5 µg/ml (en términos de concentración final) con PBS, y esta dilución se añadió a cada línea celular y se dejó reaccionar durante 30 minutos. Tras el lavado con PBS, se añadieron anticuerpos anti-IgG de ratón marcado fluorescentemente adjunto en el kit, a cada línea celular y se dejó en reposo durante 45 minutos en hielo. Cada línea celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. Después, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando un FACScalibur (Becton, Dickinson and Company), para obtener un valor (medio) de intensidad de fluorescencia media. También se obtuvo un valor (medio) de intensidad de fluorescencia media por el mismo ensayo anterior para los anticuerpos comparativos. El control negativo que se utilizó eran células que se hacían reaccionar con anticuerpos de isotipo de control, y también se obtuvo una media. Cada valor (medio) de intensidad de fluorescencia media se utilizó para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRINA-1 de la superficie de distintas células cancerosas reconocidas por los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1, nº 2 y nº 3 y los anticuerpos comparativos 12 a 26 eran 10^5 o más por células para todas las líneas celulares de cáncer humano examinadas. Por otra parte, el número de moléculas reconocidas por los anticuerpos comparativos 1 a 11 era menor de 10^5 por célula.

Ejemplo 9 Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 utilizando conejos

(1) Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo

Se mezclaron 300 mg de una proteína antigénica (proteína CAPRINA-1 humana) con una cantidad igual de adyuvante completo de Freund. Esta mezcla se utilizó como una solución de antígeno por conejo. Una mezcla del antígeno con el adyuvante incompleto de Freund se utilizó para los refuerzos. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada conejo de 7 semanas de edad. Después, se llevaron a cabo 7 refuerzos cada 4 semanas para completar la inmunización. Cuatro días después de la última inyección se extirpó el bazo de cada conejo y se trituró entre dos portaobjetos de cristal esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y retirada del sobrenadante por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos se repitieron 3 veces para obtener las células esplénicas. Las células esplénicas obtenidas se mezclaron con células de mieloma de conejo a una relación de 5:1. Se calentaron 200 µl de medio IMDM que contenía un 10 % de FBS a 37 °C y se mezcló con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH), y la solución de PEG preparada de esta manera se añadió a la mezcla celular, que se dejó en reposo entonces durante 5 minutos para la fusión celular. Tras retirar el sobrenadante por centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 300 ml de un medio IMDM que contenía un 10 % de FBS suplementado con un 2 % equivalente de una solución HAT (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc. /Nunc) a una concentración de 100 µl/pocillo. Las células esplénicas y las células de mieloma de conejo se fusionaron por cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones de un 5 % de CO₂ para obtener los hibridomas.

Los hibridomas preparados se exploraron en cuanto a la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas con las proteínas CAPRINA-1 como índice. Se añadió una solución de proteína CAPRINA-1 1 µg/ml a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió un 0,5 % de solución de seroalbúmina bovina (BSA) (fabricada por Sigma-Aldrich Corp.) a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución en cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadieron anticuerpos anti-conejo marcado con HRP diluido 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo del color, la reacción se finalizó con la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se

seleccionaron varios hibridomas que producían anticuerpos que tenían alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se cultivaron en placa. Una semana más tarde, se observaron los hibridomas que formaban colonias únicas en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente, y los hibridomas clonados se seleccionaron en cuanto a la reactividad de anticuerpos producidos por los hibridomas con proteínas CAPRINA-1 como índice. Se añadió una solución de proteína CAPRINA-1 de 1 µg/ml a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución del 0,5 % de BSA a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, se añadió el sobrenadante de cada hibridoma que se obtuvo anteriormente a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadieron anticuerpos anti-IgG de conejo marcado con HRP diluido 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo del color, la reacción finalizó por la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron varias líneas de hibridomas que producían anticuerpos monoclonales de conejo reactivos con CAPRINA-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales de conejo reactivos con las proteínas CAPRINA-1 se exploraron en cuanto a anticuerpos reactivos con la superficie de células cancerosas que expresan CAPRINA-1. Específicamente, 2 x 10⁵ células de cada una de una línea de cáncer de mama humano MDA-MB-231V y una línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 se centrifugaron en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante del cultivo de cada hibridoma que se obtuvo anteriormente y se dejó reposar durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se añadieron anticuerpos anti-IgG (H+L) de conejo marcado con FITC o anti IgG (H+L) de conejo marcado con Alexa 488 diluido 100 veces con PBS (-) que contenía un 0,05 % de FBS y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, la misma operación anterior se llevó a cabo utilizando un medio para el cultivo de hibridomas para preparar una muestra de control negativo. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo (anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1) que tenía una intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control negativo, es decir, reaccionaba con la superficie de las células cancerosas MDA-MB-231 y QG56 que expresaban CAPRINA-1.

A continuación, se identificó un epítipo de CAPRINA-1 reconocido por el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1. Se sintetizaron 93 péptidos candidatos que cada uno consistía en 12 a 16 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína CAPRINA-1 humana y cada uno se disolvió a una concentración de 1 mg/ml de DMSO. Cada péptido se disolvió a una concentración de 30 µg/ml en una solución tampón de carbonato sódico 0,1 M (pH 9,6). La solución se añadió a una concentración de 100 µl/pocillo en una placa de 96 pocillo (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc. /Nunc, producto Nº: 436006) y se dejó en reposo durante una noche a 4 °C. La solución de cada pocillo se desechó, y se añadieron 10 mM de etanolamina/0,1 M solución tampón de carbonato sódico (pH 9,6) a una concentración de 200 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Después, se desechó la solución de cada pocillo, y cada pocillo se lavó dos veces con PBS que contenía un 0,5 % de Tween 20 (PBST) para preparar una placa con el péptido inmovilizado. Para la verificación, se inmovilizaron proteínas CAPRINA-1 en los pocillos de esta placa para preparar otra placa de acuerdo con el método descrito anteriormente. Se añadió el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 con una concentración de 0,1 µg/ml purificado mediante un método de rutina a 50 µl/pocillo en cada placa. Después de un agitado a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución de cada pocillo se desechó, y se lavó cada pocillo tres veces con PBST. A continuación, se añadió una solución de anticuerpo secundario que contenía anticuerpos anti-IgG de conejo marcados con HRP diluidos 3000 a 4000 veces con PBST a una concentración de 50 µl/pocillo. Después, se desechó la solución de cada pocillo y se lavó cada pocillo seis veces con PBST. Se añadió una solución de sustrato TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Tras el desarrollo del color, se finalizó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrómetro de absorción. Como resultado, el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo (anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1) presentaba reactividad solo con un polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5, entre los 93 péptidos sintetizados como secuencias parciales de CAPRINA-1, y no presentaba reactividad con ninguno de los otros péptidos. También, el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 presentaba reactividad específicamente con la proteína CAPRINA-1. Este resultado demostraba que el epítipo para el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 estaba contenido en el polipéptido de SEQ ID NO: 5.

A continuación, se obtuvieron fragmentos amplificados de los genes que codifican la región variable del anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 obtenido anteriormente y analizado en cuanto a sus secuencias genéticas y secuencias de aminoácidos de los mismos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 del

documento WO2010/016526. Específicamente, se extrajo el ARNm del hibridoma que producía el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1. Se obtuvieron los genes de la región variable de cadena pesada (HV) y la región variable de cadena ligera (VL) de este anticuerpo se obtuvieron por RT-PCR utilizando cebadores específicos de las secuencias variables de conejo. Para la secuenciación, los genes se clonaron en vectores pCR2.1 (fabricados por Invitrogen Corp.). Las secuencias genéticas de las regiones VH y VL de cada plásmido que se obtuvieron por clonación se determinaron cada uno utilizando un cebador directo M13 y un cebador inverso M13, y un secuenciador de fluorescencia.

Como resultado, se confirmó que el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 comprende una región variable de cadena pesada que se muestra en SEQ ID NO: 52, en el que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y una región variable de cadena ligera que se muestra en SEQ ID NO: 54, en el que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena ligera consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13, respectivamente.

(2) Preparación del anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1

Un gen que se muestra en SEQ ID NO: 51 para la expresión de la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 que se obtuvo anteriormente y un gen que se muestra en SEQ ID NO: 53 para la expresión de la región variable de cadena ligera del mismo se insertaron en un vector para la expresión en células de mamífero que tenían un gen insertado de una región constante de cadena pesada de IgG1 humana y un vector para la expresión en células de mamífero que tenía un gen insertado de una región constante de cadena ligera de IgG1 humana, respectivamente. Estos dos vectores de expresión recombinantes preparados se introdujeron en células de mamífero de acuerdo con un método de rutina para obtener un sobrenadante de cultivo que contenía un anticuerpo de conejo anti-CAPRINA-1 humanizado (anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1).

(3) Especificidad, reactividad con células cancerosas, y actividad antitumoral del anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1

El sobrenadante del cultivo del anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 obtenido en el Ejemplo 9 (2) se purificó de acuerdo con un método de rutina utilizando una Sepharose FF Hitrap Proteína A (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Tras la sustitución con PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 mm (fabricado por Millipore Corp.) y entonces se evaluó en cuanto a su especificidad de antígeno, reactividad con células cancerosas, y efecto antitumoral.

En primer lugar, el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 se examinó en cuanto a su reactividad con las proteínas CAPRINA-1 y un polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 como epítipo para el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1. Como resultado, se confirmó que el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano de conejo nº 1 tenía especificidad de reacción con la proteína CAPRINA-1 y el polipéptido que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, como con el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1.

A continuación, se examinó el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 respecto a su reactividad con las proteínas CAPRINA-1 de la superficie de las 9 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231, MRK-nu-1 y MDA-MB-468), las 3 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2 y ACHN), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), las 3 líneas celulares de cáncer ovárico (SKOV3, IGROV1, y OVCAR3), las 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las líneas celulares de cáncer de próstata (PC3 y DU-145), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las 2 líneas celulares de tumor cerebral (T98G y U87MG), la línea celular de cáncer gástrico (MNK28), las 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1, y HCT-116), las 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPC-3), la línea celular de leucemia AML5, y la línea celular de linfoma Ramos de las que se había confirmado que tenían expresión genética de CAPRINA-1. Se centrifugaron 10^6 células de cada línea celular en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Cada sobrenadante del cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo se añadió al tubo y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se añadieron los anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) humana marcados con Alexa 488 (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 100 veces con PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejaron en reposo a 4 °C durante 60 minutos. Tras el lavado con PBS (-), se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo que se utilizó eran las células que se hacían reaccionar solo con los anticuerpos secundarios. Como resultado, el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 presentaba reactividad con una intensidad de fluorescencia al menos un 30 % más fuerte que la del control negativo. Esto demostraba que una parte de la proteína CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 se expresaba en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cánceres humanos. La tasa anterior de aumento de intensidad de fluorescencia se indicaba por la tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión: Tasa de incremento en la intensidad de fluorescencia media (Tasa de aumento de intensidad de fluorescencia (%)) = ((MFI de células que reaccionan con

los anticuerpos anti-CAPRINA-1) – (MFI de control)) / (MFI de control) x 100.

A continuación, el gen que se muestra en SEQ ID NO: 51 para la expresión de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 y un gen que se muestra en SEQ ID NO: 53 para la expresión de la región variable de cadena ligera del mismo se insertaron en un vector para la expresión en células de mamífero que tenía un gen insertado de una región constante de cadena pesada de IgG1 de ratón y un vector para la expresión en células de mamífero que tenía un gen insertado de una región constante de cadena ligera de IgG1 de ratón, respectivamente. Estos dos vectores de expresión recombinantes preparados se introdujeron en células de mamífero de acuerdo con un método de rutina para obtener un sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal quimérico anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1, que se purificó entonces de la misma manera que anteriormente para obtener un anticuerpo monoclonal quimérico anti-CAPRINA-1 de ratón-conejo nº 1 purificado. El anticuerpo monoclonal quimérico anti-CAPRINA-1 de ratón-conejo nº 1 se utilizó para medir el número de moléculas de SEQ ID NO: 5 sobre las células cancerosas humanas reconocidas por el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 utilizando un kit de ensayo "QIFKIT" disponible en el mercado (fabricado por Dako Japan Inc.). Como resultado, la línea celular de leucemia AML5 y la línea celular de linfoma Ramos tenían 10^5 moléculas por célula. Las otras líneas celulares de cánceres humanos tenían 10^5 o más moléculas por célula.

A continuación se evaluó el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 en cuanto a su actividad antitumoral contra las células cancerosas humanas que expresaban CAPRINA-1. Se recolectaron 10^6 células de cada una de las líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231, MCF7, y SK-BR-3, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, la línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, la línea celular de cáncer de riñón Caki-2, la línea celular de cáncer ovárico SKOV3, las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y DU-145, la línea celular de tumor cerebral T98G, la línea celular de cáncer gástrico MNK28, la línea celular de leucemia AML5, y la línea celular de linfoma Ramos en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que se añadieron entonces 100 mCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 °C durante 2 horas. Después las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS para preparar las células diana. El anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 obtenidos en el Ejemplo 5 se añadieron cada uno a una placa de 96 pocillos con el fondo en V a una concentración final de 5 µg/ml. Posteriormente, se separaron células NK humanas de entre los linfocitos de sangre periférica humana preparada de acuerdo con un método de rutina, y se añadieron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo. Las células NK humanas que se utilizaron se separaron utilizando un kit de separación de células NK (fabricado por Miltenyi Biotec K.K.) a partir de las células mononucleares de sangre periférica humana utilizando la solución Histopaque de separación por gravedad para la separación de células mononucleares de sangre periférica (Sigma-Aldrich Corp.). Las células NK se mezclaron a una densidad de 2×10^3 células/pocillo con la diana y se añadió cada anticuerpo a la placa de 96 pocillos con el fondo en V, y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO₂. Tras el cultivo, la cantidad de cromo 51 liberado por las células tumorales dañadas se midió en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRINA-1 contra las células cancerosas. El control negativo que se utilizó eran las células suplementadas con anticuerpos de isotipo de control. Como resultado, los anticuerpos de isotipo de control utilizados tenían una actividad citotóxica de menos del 6 % contra todas las líneas celulares, y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 que se utilizaron tenían una actividad citotóxica de menos del 5 % contra MDA-MB-231V, menos del 8 % contra MCF7 y SK-Br-3, menos del 10 % contra la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, menos del 8 % contra la línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, menos del 5 % contra la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, menos del 11 % contra la línea celular de cáncer de riñón Caki-2, menos del 12 % contra la línea celular de cáncer ovárico SKOV3, menos del 10 % contra las líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y DU-145, menos del 7 % contra la línea celular de tumor cerebral T98G, menos del 12 % contra la línea celular de cáncer gástrico MNK28, y menos del 3 % contra la línea celular de leucemia AML5 y la línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 presentaba una actividad del 23 % contra MDA-MB-231V, del 38 % contra MCF7, del 23 % contra SK-Br-3, del 28 % contra la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, del 35 % contra la línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, del 25 % contra la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, del 23 % contra la línea celular de cáncer de riñón Caki-2, del 24 % contra la línea celular de cáncer ovárico SKOV3, del 18 % contra las líneas celulares de cáncer de próstata PC3, del 20 % contra DU-145, del 15 % contra la línea celular de tumor cerebral T98G, del 20 % contra la línea celular de cáncer gástrico MNK28, y del 9 % contra la línea celular de leucemia AML5 y la línea celular de linfoma Ramos. Estos resultados demostraban que el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 contra el péptido derivado de CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 ejerce una actividad antitumoral contra las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 mediante una actividad ADCC, y también demostraban que el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 presenta una actividad citotóxica más fuerte contra las células cancerosas humanas que la de los anticuerpos comparativos 1 a 26.

Estos resultados acerca de la actividad citotóxica se obtuvieron: mezclando el anticuerpo contra CAPRINA-1 utilizado en la presente invención, linfocitos (población celular que contiene las células NK), y 2×10^3 células de cada línea celular de cáncer con cromo 51 incorporado, como se ha descrito anteriormente: cultivar las células durante 4 horas; tras el cultivo, medir la cantidad de cromo 51 liberado en el medio; y calcular la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente expresión*:

* Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con anticuerpo contra CAPRINA-1 y linfocitos (células NK) / Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana suplementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100 (todas estas cantidades de cromo 51 excluyen la cantidad de cantidad de cromo 51 liberado espontáneamente.

(4) Actividad antitumoral del anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 conjugado con el agente antitumoral

Se examinó un anticuerpo anti-CAPRINA-1 conjugado con un agente antitumoral en cuanto a su efecto por el siguiente estudio: Se utilizó un anticuerpo anti-IgG humana unido a saporina como fármaco modelo de agente antitumoral (Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, Inc.)) para evaluar si el conjugado de anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 y el Hum-Zap podía ejercer un efecto antitumoral en las líneas celulares de cáncer. La saporina ejerce un efecto destructor cuando se incorpora en las células.

Se inocularon una línea celular de cáncer de mama humano SK-BR-3, una línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y células de cáncer de próstata humano PC-3 en un medio RPMI que contenía un 10 % de FBS en una placa de 96 pocillos con una densidad de 5×10^2 células/pocillo. Al mismo tiempo, se añadió el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 o un anticuerpo IgG1 humano de isotipo de control como anticuerpo primario a una concentración final de 300 ng/ml. Posteriormente se añadió el Hum-ZAP como anticuerpo secundario a una concentración final de 300 ng/ml y se cultivaron las células a 37 °C durante 5 días. Después del día 5, se midió la absorbancia utilizando el kit-8 de recuento celular (Dojindo Laboratories) y un lector de microplacas para evaluar el crecimiento celular.

Como resultado, la media de absorbancia (DO) obtenida utilizando el anticuerpo de isotipo de control era de 0,77 para SL-BR-3, 1,93 para Capan-2, y 2,01 para PC-3, mientras que la media de la absorbancia obtenida utilizando el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 era de 0,34 para SL-Br-3, 1,62 para Capan-2, y 1,62 para PC-3. Estos resultados demostraban que el conjugado del anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 y la saporina unida al anticuerpo anti-IgG humana se incorpora en las células cancerosas al unirse el anticuerpo quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1 a la CAPRINA-1 en la superficie de la membrana de las células cancerosas para presentar una actividad antitumoral mediada por saporina.

(5) Preparación de los anticuerpos humanizados anti-CAPRINA-1 nº 1, nº 2 y nº 3

A continuación se preparó un anticuerpo humanizado del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1. Basándose en la información de secuencia de aminoácidos sobre la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 confirmado en el Ejemplo 9 (2), se diseñó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 15 de manera que es capaz de expresar una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 16) que contiene las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 14, respectivamente, y las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpos humanos. Esta secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. Al igual, se diseñó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17 de manera que fuera capaz de expresar una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 18) que contenía las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13, respectivamente, las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpo humano. Esta secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena ligera de IgG1 humana. Estos dos vectores de expresión recombinantes se introdujeron en células de mamífero de acuerdo con una técnica de rutina para obtener un sobrenadante de cultivo que contiene un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1 (anticuerpo humanizado anti-CAPRINA-1 nº 1).

Basándose en la información de secuencia de aminoácidos sobre la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1, también se diseñó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 20 de manera que es capaz de expresar una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 21) que contiene las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 10, respectivamente, y las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpos humanos. La secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. Al igual, se diseñó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 de manera que fuera capaz de expresar una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 23) que contenía las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13, respectivamente, las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpo humano. Esta secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena ligera de IgG1 humana. Estos dos vectores de expresión recombinantes se introdujeron en células de mamífero de acuerdo con una técnica de rutina para obtener un sobrenadante de cultivo que contiene un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CAPRINA-1 de conejo nº 2 (anticuerpo humanizado anti-CAPRINA-1 nº 2).

Basándose en la información de secuencia de aminoácidos sobre la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo nº 1, se diseñó adicionalmente la secuencia de nucleótidos de

SEQ ID NO: 24 de manera que es capaz de expresar una región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 25) que contiene las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 10, respectivamente, y las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpos humanos. La secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. Al igual, se diseñó la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 de manera que fuera capaz de expresar una región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 23) que contenía las CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en los aminoácidos de SEQ ID NO: 11, 12, y 13, respectivamente, las regiones marco conservadas derivadas de secuencias de anticuerpo humano. Esta secuencia de nucleótidos se insertó en un vector para expresión en células de mamífero que tiene un gen insertado de una región constante de cadena ligera de IgG1 humana. Estos dos vectores de expresión recombinantes se introdujeron en células de mamífero de acuerdo con una técnica de rutina para obtener un sobrenadante de cultivo que contiene un anticuerpo monoclonal humanizado anti-CAPRINA-1 de conejo nº 3 (anticuerpo humanizado anti-CAPRINA-1 nº 3).

(6) Especificidad de antígeno, reactividad con células cancerosas, y actividad antitumoral del anticuerpo monoclonal humanizado anti-CAPRINA-1

Estos 3 anticuerpos humanizados (anticuerpos monoclonales humanizados anti-CAPRINA-1 nº 1 a nº 3) así obtenidos se evaluaron en cuanto a su reactividad con CAPRINA-1 de la misma manera que en el Ejemplo 9 (3). Como resultado, estos anticuerpos tienen reactividad con la proteína CAPRINA-1, el epítipo peptídico que se muestra en SEQ ID NO: 5, y distintas células cancerosas al mismo nivel que el anticuerpo monoclonal quimérico anti-CAPRINA-1 humano de conejo nº 1. Estos tres anticuerpos monoclonales humanizados anti-CAPRINA-1 se evaluaron adicionalmente por su actividad antitumoral contra distintas células cancerosas (líneas celulares de cáncer de mama humano MDA-MB-231, MCF7, y Sk-Br-3, línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, línea celular de cáncer de riñón Caki-2, línea celular de cáncer ovárico SKOV3, líneas celulares de cáncer de próstata PC3 y DU-145, línea celular de tumor cerebral T98G, línea celular de cáncer gástrico MKN28, línea celular de cáncer pancreático Capan-2, línea celular de leucemia AML5 y línea celular de linfoma Ramos) de la misma manera que en el Ejemplo 9 (3). Como resultado, todos los anticuerpos presentaban una actividad antitumoral al mismo nivel que el anticuerpo monoclonal quimérico anti-CAPRINA-1 humano-de conejo nº 1.

Aplicabilidad industrial

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Composición farmacéutica para el Tratamiento y Prevención del Cáncer

<130> PH-5509-PCT

<150> JP 2012-035238

<151> 21-02-2012

<160> 54

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 5562

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(2319)

<223>

<400> 1

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccc cggagcgcgc gacactgccc	120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc 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 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 ccg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	

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

ES 2 643 241 T3

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

Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly			
625	630	635	
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151		
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser			
640	645	650	
cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat	2199		
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr			
655	660	665	670
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247		
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala			
675	680	685	
cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa	2295		
Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln			
690	695	700	
atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca	2349		
Met Asn Thr Gln Gln Val Asn			
705			
aaaacacact ggccagtgtt ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttgttct	2409		
ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat	2469		
tgtcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactatct ttactctgca tgttctgtcc	2529		
taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctcagattcc tcacccttgc ttaggagtaa	2589		
aacaatatac tttacagggt gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag	2649		
gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctcga gttattcaat	2709		
gataactgac aaactaaatt atttccttag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtggtt	2769		
tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acgttcagat	2829		
gcataccaaa ttatgcatgg gtccataatca cacatataag gctggctacc agctttgaca	2889		
cagcactgtt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac	2949		
agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaattag gctttgattg gcactttttg	3009		
aaaaatatgc aacaaatatg ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa	3069		
tatttagata cctttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat	3129		
tggtagctatc 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 agtatgtgtt	3369		
ttagattgat ttccctgttt cagggaaatc acggacagta gtttcagttc tgatgggtata	3429		
agcaaaaacaa ataaaacgtt tataaaagtgt gtatcttgaa aactgggtgt tcaacagcta	3489		
gcagcttatg tgattcacc ccatgccacgt tagtgtcaca aatttttatgg tttatctcca	3549		

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
taatgggtatt	ttctgtgcag	aaattaaatt	ttattttcag	catttagccc	aggaattctt	3909
ccagtaggtg	ctcagctatt	taaaaacaaa	actattctca	aacattcatc	attagacaac	3969
tgaggttttt	gctggttttg	taacctacca	aatggatag	gctggtgaac	attccacatt	4029
caaaagtttt	gtagggtggt	gggaaatggg	ggatcttcaa	tgtttatttt	aaaataaaat	4089
aaaataagtt	cttgactttt	ctcatgtgtg	gttgtgtgtac	atcatattgg	aagggttaac	4149
ctgttacttt	ggcaaatgag	tatttttttg	ctagcacctc	cccttgcttg	ctttaaataga	4209
catctgcctg	ggatgtacca	caaccatatg	ttacctgtat	cttaggggaa	tggtataaat	4269
atttgtgggt	tactgggtaa	tccttagatg	atgtatgctt	gcagtcctat	ataaaactaa	4329
atttgcctatc	tgtgtagaaa	ataatttcat	gacatttaca	atcaggactg	aagtaagttc	4389
ttcacacagt	gacctctgaa	tcagtttcag	agaagggatg	ggggagaaaa	tgcccttctag	4449
gttttgaact	tctatgcatt	agtgcagatg	ttgtgaatgt	gtaaagggtg	tcatagtttg	4509
actgtttcta	tgtatgtttt	ttcaaagaat	tgttcctttt	tttgaactat	aatttttctt	4569
tttttggtta	ttttaccatc	acagttttaa	tgtatatctt	ttatgtctct	actcagacca	4629
tattttttaa	ggggtgcctc	attatggggc	agagaacttt	tcaataagtc	tcattaagat	4689
ctgaatcttg	gttctaagca	ttctgtataa	tatgtgattg	cttgtcctag	ctgcagaagg	4749
ccttttggtt	ggtcaaagtc	atatttttagc	agagtttcaa	ggaaatgatt	gtcacacatg	4809
tcactgtagc	ctcttggtgt	agcaagctca	catacaaaat	acttttgtat	atgcataata	4869
taaatcatct	catgtggata	tgaaacttct	ttttttaaac	ttaaaaaggt	agaatgttat	4929
tgattacctt	gattagggca	gttttatttc	cagatcctaa	taattcctaa	aaaatatgga	4989
aaagtttttt	ttcaatcatt	gtacottgat	attaaaacaa	atatccttta	agtatttcta	5049
atcagtttagc	ttctacagtt	cttttgtctc	cttttatatg	cagctcctac	gtgggagact	5109
tttccactta	aaggagacat	agaatgtgtg	cttattctca	gaaggttcat	taactgaggt	5169
gatgagttaa	caactagttg	agcagtcagc	ttcctaagtg	ttttaggaca	tttgttcatt	5229
atattttccg	tcataataact	agaggaagtg	gaatgcagat	aagtgcgaa	ttcaaaccct	5289
tcatttttatg	tttaagctcc	tgaatctgca	ttccacttgg	gttggtttta	agcattctaa	5349
atttttagttg	attataagtt	agatttcaca	gaatcagtat	tgcccttgat	cttgtccttt	5409
ttatggagtt	aacggggagg	aagaccctc	aggaaaacga	aagtaaattg	ttaaggctca	5469

tcttcataacc tttttccatt ttgaatccta caaaaataact gcaaaagact agtgaatgtt 5529

taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

<210> 2

<211> 709

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<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 2 643 241 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 2 643 241 T3

450		455		460
Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala				
465		470		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		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		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 2 643 241 T3

Thr Gln Gln Val Asn
705

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

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

<400> 3

```

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg      60
ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgcc      120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgattccag 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

```

15

ES 2 643 241 T3

160	165	170	
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat			759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr			
175	180	185	190
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag			807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln			
	195	200	205
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa			855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu			
	210	215	220
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag			903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu			
	225	230	235
cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat			951
Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn			
	240	245	250
ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac			999
Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp			
	255	260	265
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
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

Ser 415	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro 420	Asn	Gln	Val	Pro	Val 425	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr 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	
						485					490					
gct	ggg	aca	agc	aaa	cct	tta	cat	agc	agt	gga	atc	aat	gta	aat	gca	1719
Ala	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Asn	Ala	
495					500					505					510	
gct	cca	ttc	caa	tcc	atg	caa	acg	gtg	ttc	aat	atg	aat	gcc	cca	gtt	1767
Ala	Pro	Phe	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Pro	Val	
				515					520					525		
cct	cct	gtt	aat	gaa	cca	gaa	act	tta	aaa	cag	caa	aat	cag	tac	cag	1815
Pro	Pro	Val	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gln	
			530					535					540			
gcc	agt	tat	aac	cag	agc	ttt	tct	agt	cag	cct	cac	caa	gta	gaa	caa	1863
Ala	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	His	Gln	Val	Glu	Gln	
		545					550					555				
aca	gag	ctt	cag	caa	gaa	cag	ctt	caa	aca	gtg	gtt	ggc	act	tac	cat	1911
Thr	Glu	Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His	
						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	

cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala	
675 680 685	
cca cga ggt aat att ttg tgg tgg tga tcctagctcc taagtggagc	2294
Pro Arg Gly Asn Ile Leu Trp Trp	
690	
ttctgttctg gccttggaag agctgttaat agtctgcatg ttaggaatac atttatcctt	2354
tccagacttg ttgctaggga ttaaataaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttggacc	2414
caaattttta tttttgaatg atttaatttt ccctgttact atataaactg tcttgaaaac	2474
tagaacatat tctcttctca gaaaaagtgt ttttccaact gaaaattatt tttcaggtcc	2534
taaaacctgc taaatgtttt taggaagtac ttactgaaac atttttgtaa gacatttttg	2594
gaatgagatt gaacatttat ataaatttat tattcctctt tcattttttt gaaacatgcc	2654
tatttatatt tagggccaga caccctttaa tggccggata agccatagtt aacatttaga	2714
gaaccattta gaagtgatag aactaatgga atttgcaatg ccttttggac ctctattagt	2774
gatataaata tcaagttatt tctgactttt aaacaaaact cccaaattcc taacttattg	2834
agctatactt aaaaaaatt acaggtttag agagtttttt gtttttcttt tactgttgga	2894
aaactacttc ccattttggc aggaagttaa cctatttaac aattagagct agcatttcat	2954
gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgagggagg ttaaacaatca aacaggtttc	3014
ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgtaaggag gaattacaac gtactttgat	3074
ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaaaaat taatggatca	3134
cttggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta	3194
tggtctttcc cacttgtag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc	3254
tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat	3314
gttatgtagt ttctttttta cagtttaggt aataaggtct gttttcattc tgggtgctttt	3374
attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga	3434
atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgctgtatct attcccaacg	3494
cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa tatttggtga atgaatgaa	3553

<210> 4
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

ES 2 643 241 T3

Met	Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	His	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Ser	Gly	1	5	10	15
Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	20	25	30	
Gly	Ala	Ala	Ala	Pro	Ala	Ser	Gln	His	Pro	Ala	Thr	Gly	Thr	Gly	Ala	35	40	45	
Val	Gln	Thr	Glu	Ala	Met	Lys	Gln	Ile	Leu	Gly	Val	Ile	Asp	Lys	Lys	50	55	60	
Leu	Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Asp	Tyr	Gln	Glu	65	70	75	80
Arg	Met	Asn	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Asn	Gln	Asp	Gln	Leu	Asp	Ala	Val	85	90	95	
Ser	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Asn	Asn	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Leu	100	105	110	
Gln	Arg	Ser	Phe	Met	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Lys	115	120	125	
Lys	Thr	Ala	Arg	Arg	Glu	Gln	Leu	Met	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Gln	Lys	130	135	140	
Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Leu	Asp	Lys	Leu	Gly	145	150	155	160
Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Gln	Gly	Leu	Asn	Gly	Val	Pro	165	170	175	
Ile	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	180	185	190	
Val	Asp	Pro	Glu	Arg	Asp	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Gln	Tyr	Glu	195	200	205	
His	Ala	Ser	Ile	His	Leu	Trp	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Glu	Lys	Pro	210	215	220	
Val	Cys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Val	225	230	235	240
Phe	Gln	Ser	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser	Thr	His	Asn	His	Gln	Asn	Gly	Leu	245	250	255	
Cys	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Asp	Gln	Val	260	265	270	

ES 2 643 241 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 2 643 241 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> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

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

<210> 6
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 6

ES 2 643 241 T3

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

ES 2 643 241 T3

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

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

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

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

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

<210> 7
<211> 106
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

<210> 8
<211> 6
<212> PRT
<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 8

ES 2 643 241 T3

Gly Ser Tyr Tyr Met Ser
1 5

5

<210>	9
<211>	17
<212>	PRT
<213>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
<400>	9

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

10	Gly
	<210> 10
	<211> 4
	<212> PRT
15	<213> <i>Oryctolagus cuniculus</i>
	<400> 10

Gly Asn Lys Leu
1

20
 <210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*
 25
 <400> 11

Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

30 <210> 12
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

35 <400> 12

Asp Ala Ser Asn Leu Asp Ser
1 5

40

<210>	13
<211>	14
<212>	PRT
<213>	<i>Oryctolagus cuniculus</i>
<400>	13

Gln Cys Thr Ala Val Ser Ser Ala Thr Ile Tyr Gly Asn Ala
1 5 10

50 <210> 14
 <211> 4
 <212> PRT

	<213> Artificial	
	<220>	
	<223> humanizado	
5	<400> 14	
	Gly Asn Arg Leu	
	1	
10	<210> 15	
	<211> 399	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
15	<220>	
	<223> humanizado	
	<220>	
	<221> secuencia de señal	
20	<222> (1)..(57)	
	<223>	
	<220>	
	<221> CDS	
25	<222> (58)..(399)	
	<223>	
	<400> 15	
	atggagttcgg ggctgagctg ggtctttctg gtcgctatta tcaaaggtgt ccagtggt	57
	cag gtg cag ttg gtc gag tcc ggg gga ggc ctg gtc aag cct ggg gga	105
	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly	
	1 5 10 15	
	tcc ctg aga ctc tct tgc gct gcc tct gga ttc tcc ttc agt ggc agc	153
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser	
	20 25 30	
	tac tac atg tcc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg	201
	Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp	
	35 40 45	
	atc gca tac att tat att ggt gac ggt gtc act gcc tac gcg aac tgg	249
	Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp	
	50 55 60	
	gcg aaa ggc cga ttc acc atc tcc aga gat aac gca aag aat agc ctg	297
	Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu	
	65 70 75 80	
	tac cta caa atg aac agt ctg cgc gcc gag gac acg gcc gtt tat ttc	345
	Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe	
	85 90 95	
	tgt gcg agg ggt aat agg ttg tgg ggc cag ggc acc ctg gtc acc gtc	393
	Cys Ala Arg Gly Asn Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
	100 105 110	
	tcc tca	399
30	Ser Ser	

ES 2 643 241 T3

<210> 16
<211> 114
<212> PRT
<213> Artificial

5

<220>
<223> humanizado

<400> 16

10

```

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser
          20          25          30

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

Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
          50          55          60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu
65          70          75          80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
          85          90          95

Cys Ala Arg Gly Asn Arg Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
          100          105          110

Ser Ser

```

<210> 17
<211> 402
<212> ADN
<213> Artificial

15

<220>
<223> humanizado

20

<220>
<221> secuencia de señal
<222> (1)..(66)
<223>

25

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(402)
<223>

30

<400> 17

```

atggacatga ggggtgccgc acagctgctg gggctcctgc tgctctggct ctctggtgcc      60
agatgt gat att cag atg acc cag agc cca agc tcc ctc agc gca gct      108
    Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ala
        1             5             10

gtg gga gac cgc gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag agc att agt      156
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser
    15             20             25             30

agc tac tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aag cct ccc aag cgc      204
Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Arg
        35             40             45

ctg atc tat gat gca tcc aat ctg gat tct ggg gtc cca tcg cgg ttc      252
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
        50             55             60

tcc ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act ttt acc atc agc agc ctg      300
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
        65             70             75

cag cct gag gat atc gcc act tac tac tgt caa tgc act gct gtt agt      348
Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Ala Val Ser
        80             85             90

agt gct act att tat gga aat gct ttc ggc gga ggg acc aag gtg gag      396
Ser Ala Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
    95             100             105             110

atc aaa
Ile Lys
                                402

```

<210> 18
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> humanizado

<400> 18

```

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

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

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

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

```

ES 2 643 241 T3

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

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

Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> humanizado
<400> 19

Ile Ser Gln Ala Val His Ala Ala His Ala Glu Ile Asn Glu Ala Gly
1 5 10 15

Arg

<210> 20
<211> 399
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> humanizado

<220>
<221> secuencia de señal
<222> (1)..(57)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (58)..(399)
<223>

<400> 20

ES 2 643 241 T3

```

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctt gttgctatatt taaaagggtgt ccagtgt      57

gag gtg cag ctc gtg gaa tcc gga ggc ggc ctc gtg cag cct ggc ggc      105
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

agc ctg agg ctc tcc tgc gcc gct tcc ggc ttc tcc ttc agc ggc agc      153
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser
          20          25          30

tac tac atg agc tgg gtg agg cag gct ccc gga aag ggc ctc gag tgg      201
Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35          40          45

att gcc tac att tac atc ggc gac ggc gtc acc gcc tac gct aac tgg      249
Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
          50          55          60

gcc aaa ggc agg ttc aca atc agc aag gat aac agc aag aat acc ctc      297
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65          70          75          80

tac ctg cag atg aac tcc ctg agg gcc gaa gac aca gcc gtc tac ttt      345
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
          85          90          95

tgc gct cgg ggc aac aaa ctg tgg ggc cct ggc aca ctg gtg aca gtg      393
Cys Ala Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
          100          105          110

agc tcc      399
Ser Ser

```

<210> 21
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> humanizado

<400> 21

ES 2 643 241 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser
20 25 30

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

Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe
85 90 95

Cys Ala Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 22
<211> 402
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> humanizado

<220>
<221> secuencia de señal
<222> (1)..(66)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(402)
<223>

<400> 22


```

atggacatga ggggtccccgc tcagctcctg ggggtcctgc tactctggct ccgaggtgcc      60

agatgt gac atc cag atg acc cag agc ccc agc agc ctg agc gcc agc      108
      Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
      1           5           10

gtg ggc gac aga gtg acc atc aag tgc cag gcc agc cag agc atc agc      156
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser
15           20           25           30

agc tac ctg gcc tgg tac cag cag aag ccc ggc aag gcc ccc aag aga      204
Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg
           35           40           45

ctg atc tac gac gcc agc aac ctg gac agc ggc gtg ccc agc aga ttc      252
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
           50           55           60

agc ggc agc ggc agc ggc acc gac ttc acc ttc acc atc agc agc ctg      300
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu
           65           70           75

cag ccc gag gac atc gcc acc tac tac tgc cag tgc acc gcc gtg agc      348
Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Ala Val Ser
           80           85           90

agc gcc acc atc tac ggc aac gcc ttc ggc ggc ggc acc aag gtg gag      396
Ser Ala Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu
95           100           105           110

atc aag      402
Ile Lys

```

<210> 23
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> humanizado

<400> 23

ES 2 643 241 T3

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

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

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

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

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

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

Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 24
<211> 399
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> humanizado

<220>
<221> secuencia de señal
<222> (1)..(57)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (58)..(399)
<223>

<400> 24

```

atggagtttg ggctgagctg ggtttttcctt gttgctatatt taaaagggtgt ccagtggt      57

gag gtg cag ctc gtg gaa tcc gga ggc ggc ctc gtg cag cct ggc ggc      105
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1          5          10          15

agc ctg agg ctc tcc tgc gcc gct tcc ggc ttc tcc ttc agc ggc agc      153
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser
          20          25          30

tac tac atg agc tgg gtg agg cag gct ccc gga aag ggc ctc gag tgg      201
Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
          35          40          45

att gcc tac att tac atc ggc gac ggc gtc acc gcc tac gct aac tgg      249
Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
          50          55          60

gcc aaa ggc agg ttc aca atc agc agg gat aac agc aag aat acc ctc      297
Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65          70          75          80

tac ctg cag atg aac tcc ctg agg gcc gaa gac aca gcc gtc tac tac      345
Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
          85          90          95

tgc gct cgg ggc aac aaa ctg tgg ggc cct ggc aca ctg gtg aca gtg      393
Cys Ala Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
          100          105          110

agc tcc      399
Ser Ser

```

<210> 25
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Artificial

5

<220>
 <223> humanizado

10

<400> 25

ES 2 643 241 T3

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser
20 25 30

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

Ile Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

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

Cys Ala Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110

Ser Ser

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 26

Gly Tyr Phe Met Asn
1 5

<210> 27
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 27

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

Gly

<210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 28

Arg Ile His Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 29

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

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

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

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

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

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

Tyr Gly Ser Ser Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Glu Pro His
100 105 110

His

<210> 30
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 30

Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu
1 5 10 15

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 31

Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

ES 2 643 241 T3

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5
<400> 32

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

10
<210> 33
<211> 108
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

15
<400> 33

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

Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

20
<210> 34
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

25
<400> 34

ggacctgagc tgggtgaagcc tggggccttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctgggttac 60
tcattttactg gctactttat gaactgggtg atgcagagcc atggaaagag ccttgagtgg 120
attggacgta ttaatcctta caatgggtgat actttctaca accagaagtt caagggcaag 180
gccacattga ctgtagacaa atcctctagc acagcccaca tggagctccg gagcctggca 240
tctgaggact ctgcagtcta ttattgtgca agacgcatcc attactacta cggtagtagc 300
tactatgcta tggactactg ggggtcaagaa cctcatcac 339

ES 2 643 241 T3

<210> 35
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*
 5
 <400> 35

 gatgtccaga taaccocagtc tccatcttat cttgctgcat ctccctggaga aaccattact 60
 attaattgca gggcaagtaa gagcattagc aaatatttag cctggatatca agagaaacct 120
 gggaaaacta ataagcttct tatctactct ggatccactt tgcaatctgg aattccatca 180
 aggttcagtg gcagtggtac tggtagagat ttcactctca ccatcagtag cctggagcct 240
 gaagattttg caatgtatta ctgtcaacag cataatgaat acccgtggac gttcgggtgga 300
 ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324

 10
 <210> 36
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 15
 <400> 36

 Glu Tyr Ile Ile His
 1 5

 20
 <210> 37
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 25
 <400> 37

 Trp Phe Tyr Pro Gly Ser Gly Ser Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15

 Asp

 30
 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 <400> 38

 His Glu Val Tyr Tyr Asp Tyr Asp Lys Ser Met
 1 5 10
 35
 <210> 39
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*
 40
 <400> 39

ES 2 643 241 T3

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

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

Arg Ser Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Trp Phe Tyr Pro Gly Ser
35 40 45

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

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

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

Asp Tyr Asp Lys Ser Met Leu Trp Thr Thr Gly Val Lys Asn Leu Ile
100 105 110

Arg

<210> 40
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 40

Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
1 5 10 15

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 41

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 42
<211> 9
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 42

Gln Gln Tyr Tyr Ser Tyr Pro Tyr Thr
1 5

ES 2 643 241 T3

<210> 43
<211> 108
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 43

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

<210> 44
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

10

<400> 44

15

ggagctgggc	tggtgaaacc	cggggcatca	gtgaagctgt	cctgcaaggc	ttctggctac	60
accttcactg	agtatattat	acactgggta	aagcagaggt	ctggacaggg	tcttgagtgg	120
attgggtggt	tttaccctgg	aagtggtagt	ataaagtaca	atgagaaatt	caaggacaag	180
gccacattga	ctgcggacaa	atcctccagc	acagtctata	tggagcttag	tagattgaca	240
tctgaagact	ctgcggtcta	tttctgtgca	agacacgagg	tctactatga	ttacgacaag	300
tctatgctat	ggactactgg	ggtcaagaac	ctcatccgc			339

<210> 45
<211> 324
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

20

<400> 45

25

ES 2 643 241 T3

```
tctccatcct ccctagctgt gtcagttgga gagaagggtta ctatgagctg caagtccagt      60
cagagccttt tatatagtag caatcaaaag aactacttgg cctggtacca gcagaaacca      120
gggcagtctc ctaaactgct gatttactgg gcatccacta gggaatctgg ggtccctgat      180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tgtgaaggct      240
gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa tattatagct atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa acgg                                             324
```

<210> 46
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 46

Ser Gly Tyr Tyr Trp Asn
 1 5

<210> 47
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 47

Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
 1 5 10 15

Arg

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 48

Gly Met Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Ala Lys Asp
 1 5 10

<210> 49
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Mus musculus*

<400> 49

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

<210> 50
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Mus musculus*

<400> 50

ggacctggcc	togtgaacc	ttotcagtct	ctgtctctca	cctgctotgt	cactggctac	60
tccatcacca	gtgggttatta	ctggaactgg	atcoggcagt	ttocaggaaa	caaactggaa	120
tggatgggct	acataagcta	cgacggtagc	aataactaca	acccatctct	caaaaatoga	180
atctccatca	ctcgtgacac	atetaagaac	cagtttttcc	tgaagttgaa	ttctgtgact	240
actgaggaca	cagctacata	ttactgtgct	actgggatgg	cctgggtttgc	ttactggggc	300
aaggactctg	tcacgccgcc	t				321

<210> 51
 <211> 393
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> humanizado

<220>
 <221> secuencia de señal
 <222> (1)..(57)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (58)..(393)
 <223>

<400> 51

```

atggagactg ggctgcgctg gcttctcctg gtcgctgtgc tcaaaggtgt ccagtgt      57

cag tca ttg gag gag tcc ggg gga gac ctg gtc aag cct ggg gca tcc      105
Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1          5          10          15

ctg aca ctc acc tgc aca gcc tct gga ttc tcc ttc agt ggc agc tac      153
Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Gly Ser Tyr
          20          25          30

tac atg tcc tgg gtc cgc cag gct cca ggg aag ggg ctg gag tgg atc      201
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45

gca tac att tat att ggt gac ggt gtc act gcc tac gcg aac tgg gcg      249
Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp Ala
          50          55          60

aaa ggc cga ttc acc atc tcc aag gcc tcg tcg acc acg gtg act cta      297
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Ala Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu
65          70          75          80

caa atg acc agt ctg aca gcc gcg gac acg gcc acc tat ttc tgt gcg      345
Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
          85          90          95

agg ggt aat aag ttg tgg ggc cca ggc acc ctg gtc acc gtc tcc tca      393
Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          100          105          110

```

5 <210> 52
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> humanizado

<400> 52

ES 2 643 241 T3

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

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

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

Ala Tyr Ile Tyr Ile Gly Asp Gly Val Thr Ala Tyr Ala Asn Trp Ala
50 55 60

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

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

Arg Gly Asn Lys Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 53
<211> 402
<212> ADN
<213> Artificial

<220>
<223> humanizado

<220>
<221> secuencia de señal
<222> (1)..(66)
<223>

<220>
<221> CDS
<222> (67)..(402)
<223>

<400> 53

atggacacga gggccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct ccaggtgcc 60

agatgt gat gtt gtg atg acc cag act cca gcc tcc gtg gag gca gct 108
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Ala Ala
1 5 10

ES 2 643 241 T3

```

gtg gga ggc aca gtc acc atc aag tgc cag gcc agt cag agc att agt      156
Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser
15                      20                      25                      30

agc tac tta gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg cag cct ccc aag cgc      204
Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg
                      35                      40                      45

ctg atc tat gat gca tcc aat ctg gat tct ggg gtc cca tcg cgg ttc      252
Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
                      50                      55                      60

aaa ggc agt gga tct ggg aca gac ttc act atc acc atc agc gac ctg      300
Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Ile Thr Ile Ser Asp Leu
                      65                      70                      75

gag tgt gcc gat gct gcc act tac tac tgt caa tgc act gct gtt agt      348
Glu Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Ala Val Ser
                      80                      85                      90

agt gct act att tat gga aat gct ttc ggc gga ggg acc gag gtg gtg      396
Ser Ala Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val
95                      100                      105                      110

gtc aaa
Val Lys
402

```

<210> 54
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> humanizado

<400> 54

```

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

Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20                      25                      30

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

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly
50                      55                      60

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

Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Cys Thr Ala Val Ser Ser Ala
85                      90                      95

Thr Ile Tyr Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100                      105                      110

```

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tienen reactividad inmunológica con un polipéptido parcial de CAPRINA-1, que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5.
2. El anticuerpo o un 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 CAPRINA-1.
3. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
4. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo multiespecífico.
5. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden:
 - (i) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9 y 10 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 11, 12, y 13 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (ii) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9 y 14 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 11, 12, y 13 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (iii) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 26, 27 y 28 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 30, 31, y 32 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (iv) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 36, 37 y 38 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (v) una región variable de cadena pesada que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 46, 47 y 48 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende las regiones determinantes de complementariedad que tienen las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 40, 41, y 42 (CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente) y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.
6. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5 parte (i), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprende:
 - (i) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 52 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 54 y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (ii) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 23 y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1; o
 - (iii) una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 25 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 23 y tiene reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.
7. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5 parte (ii), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 16 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 18 y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.
8. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5 parte (iii), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 29 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 33 y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.

- 5 9. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5 parte (iv), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 39 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 43 y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.
- 10 10. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 5 parte (v), en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 49 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 43 y tienen reactividad inmunológica con la proteína CAPRINA-1.
11. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.
- 15 12. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un fármaco de combinación que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
- 20 14. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, o la composición de acuerdo con la reivindicación 12, o el fármaco de combinación de acuerdo con la reivindicación 13, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 25 15. El anticuerpo, el fragmento, la composición farmacéutica o el fármaco de combinación para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
- 30 16. Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.