

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 115**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)
A61P 35/02	(2006.01)
C07K 16/30	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)
A61K 39/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/JP2012/069857**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013 WO13018892**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12819759 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.11.2017 EP 2740793**

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

30 Prioridad:

04.08.2011 JP 2011171332

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

20.03.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 660 115 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención de cáncer

5 **Campo técnico**

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

10 **Antecedentes de la técnica**

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

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

En los últimos años, se han obtenido por todo el mundo diversos fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer usando como diana proteínas antigénicas en las células cancerosas. Estos fármacos han recibido atención debido a su cierta eficacia como agentes terapéuticos específicos para el cáncer. Una gran mayoría de las proteínas antigénicas utilizadas como diana por los fármacos, sin embargo, se expresan también en células normales. Como resultado de la administración de anticuerpos, las células cancerosas, así como las células normales que expresan los antígenos están dañadas, dando como resultado desventajosamente efectos adversos. Por lo tanto, si se pueden identificar los antígenos cancerígenos expresados específicamente en la superficie de las células cancerosas y se pueden usar los anticuerpos dirigidos a los antígenos como fármacos, podría esperarse que estos fármacos de anticuerpos proporcionen un tratamiento con menos efectos adversos.

La proteína citoplasmática y asociada a la proliferación 1 (CAPRINA-1) se conoce como una proteína intracelular que se expresa cuando las células normales que están en fase de reposo se activan para la división celular y forma gránulos de estrés citoplasmáticos con los ARN en las células para participar en la regulación del transporte y la traducción de los ARNm. Se ha descubierto que esta proteína se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, se está estudiando como diana para fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer (bibliografía de patente 2 y 3).

Lista de citas

55 Bibliografía de patente

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

Bibliografía de patente 2: documento WO2010/016526

Bibliografía de patente 3: documento WO2010/016525

60

Bibliografía no de patente

Bibliografía no de patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, vol. 24, págs. 551-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)

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

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

65

Bibliografía no de patente 4: Int. J. Cancer, 72:965-971 (1997)
 Bibliografía no de patente 5: Cancer Res., 58:1034-1041 (1998)
 Bibliografía no de patente 6: Int. J. Cancer, 29:652-658 (1998)
 Bibliografía no de patente 7: Int. J. Oncol., 14:703-708 (1999)
 5 Bibliografía no de patente 8: Cancer Res., 56:4766-4772 (1996)
 Bibliografía no de patente 9: Hum. Mol. Genet. 6:33-39, 1997

Sumario de la invención

10 Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo dirigido a la CAPRINA-1 que se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y tiene mejor actividad antitumoral que los anticuerpos convencionales y proporcionar el anticuerpo para su uso como agente para el tratamiento y/o la prevención del cáncer.
 15

Solución al problema

La presente invención tiene los siguientes aspectos:
 20

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende la misma como principio activo.
 25

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

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

Efectos ventajosos de la invención

El anticuerpo contra la CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención daña las células cancerosas. Por lo tanto, el anticuerpo contra la CAPRINA-1 es útil en el tratamiento y/o prevención del cáncer.
 40

Descripción de las realizaciones

El anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal y es, preferentemente, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo contra CAPRINA-1 según la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo que puede ejercer actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, los anticuerpos recombinantes, por ejemplo, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos y anticuerpos de cadena sencilla (scFv), anticuerpos humanos y sus fragmentos de anticuerpo, por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv. Estos anticuerpos y fragmentos de los mismos pueden prepararse mediante métodos generalmente conocidos por los expertos en la materia. En el caso de un sujeto humano, es deseable un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para inhibir o suprimir reacciones de rechazo.
 45
 50

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.
 55

El anticuerpo contra el polipéptido CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención puede examinarse por su actividad antitumoral, tal como se describe más adelante, examinando in vivo la inhibición del crecimiento tumoral en un animal con cáncer o examinando ex vivo la presencia o ausencia de actividad citotóxica mediada por inmunocitos o por el complemento exhibida por el anticuerpo contra células tumorales que expresan el polipéptido.
 60

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

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

<Preparación del antígeno para la preparación de anticuerpos>

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

Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de CAPRINA-1 humana y los homólogos de las mismas pueden obtenerse, por ejemplo, accediendo a GenBank (NCBI, EE.UU.) y usando los algoritmos BLAST o FASTA (Karlin y Altshul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993; y Altshul y col., 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 CAPRINA-1 diana es ácidos nucleicos o proteínas que consisten en secuencias que tienen de un 70 % a un 100 %, preferentemente del 80% al 100%, más preferentemente de un 90% a un 100 %, aún más preferentemente de un 95% a un 100 %, por ejemplo, del 97% al 100%, del 98% al 100%, de un 99% a un 100 % o de un 99,5 % a un 100% de identidad de secuencia respecto de la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos del ORF o la porción madura de la secuencia de referencia. En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos respecto del número total de aminoácidos (o bases nucleotídicas) cuando se alinean dos secuencias de tal forma que pueda lograrse el máximo grado de similitud o identidad con o sin huecos introducidos.

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

Los fragmentos polipeptídicos que comprenden las proteínas CAPRINA-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas se pueden sintetizar según métodos de síntesis química, por ejemplo, los métodos de Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experimentation Course en inglés) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). Asimismo, estos polipéptidos pueden sintetizarse mediante métodos convencionales usando diversos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. Como alternativa, pueden prepararse polinucleótidos que codifican los polipéptidos usando estrategias de ingeniería genética conocidas en la materia (Sambrook y col., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) e incorporarse en vectores de expresión, que después se introducen en células huésped para producir los polipéptidos en las célula huésped. De esta manera, se pueden obtener las proteínas CAPRINA-1 o fragmentos de polipéptidos de las mismas de interés.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse fácilmente mediante estrategias de ingeniería genética conocidas en la técnica o métodos rutinarios que usan sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el mercado. Por ejemplo, puede prepararse un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del gen de la CAPRINA-1 mediante la PCR usando un ADN cromosómico humano o una biblioteca de ADNc como molde y un par de cebadores diseñados para que sean capaces de amplificar la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Las condiciones de reacción para esta PCR pueden determinarse de manera adecuada. Ejemplos de las condiciones pueden incluir, pero sin limitación, 30 ciclos que implican cada uno etapas de reacción que consisten en 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante de 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (elongación) usando ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa, Pfu polimerasa o similares) y un tampón para PCR que contiene Mg²⁺, seguido de reacción a 72 °C durante 7 minutos. La estrategia de la PCR, condiciones, etc. se describen en, por ejemplo, Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (particularmente, capítulo 15).

Asimismo, pueden prepararse sondas o cebadores adecuados basándose en información acerca de las secuencias de nucleótidos del gen de CAPRINA-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRINA-1 y usarse en la exploración de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, dicha biblioteca de ADNc se produce a partir de células, órganos o tejidos que expresan las proteínas CAPRINA-1. Los ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos procedentes de los testículos o de cánceres o tumores, tales como leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer pancreático y

cáncer colorrectal. Estas operaciones, que incluyen la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la técnica y pueden realizarse de acuerdo con los métodos descritos en, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), and Ausubel y col., (ibid.). Los ADN que codifican las proteínas CAPRINA-1 humanas y los péptidos parciales de las mismas pueden obtenerse a partir de los ADN obtenidos de este modo.

Las células huésped en las que se introducen los vectores de expresión pueden ser cualquier célula capaz de expresar los péptidos anteriores. Los ejemplos de células procariotas incluyen, pero sin limitación, *E. coli*. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, pero sin limitación: células de mamífero, tales como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una línea celular de riñón embrionario humano HEK293; la línea celular de piel embrionaria de ratón NIH3T3; células de levadura, tales como células de levadura en gemación y de levadura en fisión; células de gusano de seda; y células de huevo de *Xenopus*.

En caso de usar células procariotas como células huésped, los vectores de expresión usados pueden tener un origen que permita la replicación en las células procariotas, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, un sitio de clonación múltiple, un terminador, un gen de resistencia a fármacos, un gen complementario auxótrofo, etc. Los ejemplos de vectores de expresión para *E. coli* pueden incluir la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET y sistemas de expresión pGEX. Los ADNc que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que posteriormente se transforman las células huésped procariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células huésped procariotas. En este sentido, los polipéptidos se pueden expresar como proteínas de fusión con otras proteínas.

En caso de usar células procariotas como células huésped, se pueden usar vectores de expresión para células eucarióticas que tengan un promotor, una región de cote y empalme, un sitio de adición de poli (A), etc. como vectores de expresión. Ejemplos de tales vectores de expresión pueden incluir los vectores pKAI, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que anteriormente, los ADNc que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que posteriormente se transforman las células huésped eucariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células huésped eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, los polipéptidos pueden expresarse como varias proteínas de fusión marcadas con el marcador His (por ejemplo, (His)₆ a (His)₁₀), etiqueta FLAG, etiqueta myc, etiqueta HA, GFP o similares.

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

El polipéptido de interés puede aislarse y purificarse a partir de las células hospedadoras mediante una combinación de operación de separación conocidos en la materia. Ejemplos del mismo incluyen, pero sin limitación, tratamiento con un desnaturalizante (por ejemplo, urea) o un tensioactivo, ultrasonidos, digestión enzimática, precipitación salina, fraccionamiento y precipitación de disolventes, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de isoelectrofoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.

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

<Estructura del anticuerpo>

Los anticuerpos (inmunoglobulina) normalmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden cada una al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas, a excepción de las IgM, son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, cada una compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, aunque el número de puentes disulfuro entre cadenas pesadas varía entre diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (región VL) en un extremo y tiene una región constante sencilla en el otro extremo. La región constante de la cadena ligera se alinea con la primera región constante de la cadena pesada, mientras que el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Regiones particulares denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables del anticuerpo exhiben una variabilidad específica e imparten especificidad de unión al anticuerpo. Las porciones relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera completos comprenden cada uno cuatro FR conectadas mediante tres CDR. Estas tres CDR se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden, desde el extremo N-

terminal de la cadena pesada. De forma análoga, las CDR se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR en cada cadena se mantienen próximas entre sí mediante las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR en la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión anticuerpo-antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, por ejemplo, implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fc γ , semivida/velocidad de eliminación mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada de complemento.

10 <Preparación de anticuerpos>

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 con un fragmento de la misma.

15 En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo de unirse al antígeno de CAPRINA-1 (una proteína CAPRINA-1 de longitud completa o un polipéptido parcial de la misma) in vivo. Mediante dicha unión, el anticuerpo de la presente invención frente a la CAPRINA-1, el anticuerpo ejerce la función del daño (por ejemplo, matar, suprimir, o causar la regresión de) las células tumorales. El anticuerpo de la presente invención puede dañar A tumores, tales como cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, 20 cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma como resultado de la unión a la proteína CAPRINA-1.

Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitado siempre que el anticuerpo sea anticuerpos monoclonales, y los ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). Asimismo, el anticuerpo es una clase de molécula de inmunoglobulina adecuada, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA, IgD o IgY, o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

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

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

Por ejemplo, las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 que expresan CAPRINA-1 se administran a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de este ratón. Después de la separación de los esplenocitos, se fusionan las células con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto 40 inhibidor del crecimiento de células cancerosas se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridomas). Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de células cancerosas se aíslan y se cultivan. El anticuerpo de la presente invención puede prepararse mediante purificación a partir del sobrenadante de cultivo de acuerdo con un método general de purificación por afinidad.

45 Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, del siguiente modo. En primer lugar, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización implica generalmente, inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea los antígenos sensibilizantes a mamíferos. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen o se suspenden en PBS (solución salina tamponada con fosfato), suero salino fisiológico o similares en una cantidad adecuada y después se mezclan, si se desea, con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante completo de Freund. Después de la emulsificación, se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 50 21 días. Como alternativa, se puede usar un vehículo apropiado para la inmunización con antígenos sensibilizantes.

Después de la confirmación de un aumento del nivel del anticuerpo deseado en el suero del animal inmunizado de este modo, los inmunocitos se recogen del animal y se someten a fusión celular. Ejemplos preferidos de los 55 inmunocitos incluyen, particularmente, esplenocitos.

Las células de mieloma de mamífero se usan como células progenitoras asociadas para fusionarse con los inmunocitos. En la materia se conocen varias líneas celulares, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 60 (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. y col., Cell (1976) 8,405-415), SP2/0 (Shulman, M. y col., Nature (1978) 276, 269-270), FO (deSt. Groth, S.F. y col., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) y R210 (Galfre, G. y col., Nature (1979) 277, 131-133), se usan, preferentemente, como las células de mieloma.

65 La fusión celular entre los inmunocitos y las células de mieloma puede realizarse básicamente de acuerdo con un

método conocido en la técnica, por ejemplo, el método de Kohler y Milstein (Kohler, G. y Milstein, C. *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46).

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

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

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

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

30 Además de tal obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, se pueden obtener hibridomas productores de anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (por ejemplo, actividad inhibidora del crecimiento celular) sensibilizando linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con el virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas *in vitro* y fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma de origen humano capaces de dividirse permanentemente, por ejemplo, U266 (n.º de registro TIB 196).

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

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

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

50 Los antígenos pueden prepararse de acuerdo con, por ejemplo, un método que usa células animales (publicación de patente JP (Kohyo) n.º 2007-530068 A (2007)) o un método que usa baculovirus (por ejemplo, publicación internacional n.º WO98/46777). Pueden unirse antígenos que tienen baja inmunogenicidad a macromoléculas inmunogénicas, tales como albúmina, para la inmunización. Los antígenos se pueden administrar con adyuvantes para la inmunización.

55 Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede obtenerse como anticuerpos recombinantes, que se producen usando una técnica de ingeniería genética que implica: clonar los genes del anticuerpo a partir de hibridomas; incorporar los genes de anticuerpo en vectores adecuados; e introducir los vectores en huéspedes (véase, por ejemplo, Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Específicamente, los ADNc de la región variable del anticuerpo (región V) se sintetizan a partir de los ARNm de hibridomas utilizando transcriptasa inversa. Después de la obtención de los ADN que codifican las regiones de anticuerpo V de interés, los ADN se ligan con

ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos deseadas (regiones C). Los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión. Como alternativa, los ADN que codifican la región V del anticuerpo pueden incorporarse en vectores de expresión que contienen ADN de la región C del anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión para expresarse bajo el control de regiones de control de la expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. A continuación, las células huésped se pueden transformar con los vectores de expresión resultantes y se les permite expresar anticuerpos.

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención es un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, ratón, rata, de conejo y de pollo), anticuerpos monoclonales quiméricos y similares. El anticuerpo monoclonal puede prepararse mediante el cultivo de hibridomas obtenidos mediante la fusión entre esplenocitos de mamíferos no humanos (por ejemplo, ratones o ratones productores de anticuerpos humanos, pollos y conejos) inmunizados con proteínas CAPRINA-1 o fragmentos de los mismos y células de mieloma. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo preparado a partir de una combinación de secuencias derivadas de distintos animales y es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo de ratón y regiones constantes de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico puede prepararse usando un método conocido en la materia que implica, por ejemplo: ligar los ADN que codifican regiones V de anticuerpo con ADN que codifican regiones C de anticuerpo humano; que incorpora los productos de unión resultantes en vectores de expresión; e introducir los vectores en huéspedes de modo que se producen anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos humano-ratón que tienen un efecto antitumoral se preparan mediante un método descrito más adelante en los Ejemplos. Los anticuerpos monoclonales comprenden, por ejemplo, una región variable de la cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12. En los anticuerpos monoclonales, la región VH puede comprender CDR1 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, CDR2 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, y CDR3 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 y la región VL puede comprender la CDR1 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, CDR2 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10, y CDR3 mostrada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11.

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

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

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

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

La sustitución de aminoácidos es la sustitución de, por ejemplo, inferior a 15, inferior a 10, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos aminoácidos, preferentemente de 1 a 5 aminoácidos, más preferentemente 1 o 2 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debe ser funcionalmente equivalente al anticuerpo no sustituido. Deseablemente, la sustitución es una sustitución conservadora de aminoácidos, que es la sustitución entre aminoácidos similares en sus propiedades, tales como la carga, las cadenas laterales, polaridad y carácter aromático. Los aminoácidos se pueden clasificar en términos de propiedades similares en, por ejemplo: aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína y tirosina); aminoácidos no polares (leucina,

isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina); aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina).

5 Los ejemplos de anticuerpos modificados pueden incluir anticuerpos unidos con diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). En el anticuerpo modificado de la presente invención, la sustancia a unir no está limitada. Para obtener dicho anticuerpo modificado, el anticuerpo obtenido puede modificarse químicamente. Un método para esto ya se ha establecido en la técnica.

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

15 Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido, que comprende introducir una mutación en un polipéptido, es de sobra conocido. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden introducir de manera adecuada una mutación en el anticuerpo de la presente invención usando mutagénesis de sitio dirigido (Hashimoto-Gotoh, T. y col., (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ. y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. y col., (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. EE.UU.* 82, 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) o similares, preparando de ese modo un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

25 Un anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRINA-1 descrito anteriormente se puede obtener mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo se puede obtener mediante un método que implica determinar el epítipo de la proteína CAPRINA-1 reconocido por el anticuerpo anti-CAPRINA-1 que tiene un efecto inhibidor del crecimiento de células cancerosas obtenido mediante el método convencional (por ejemplo, mapeo de epítipo) y preparar un anticuerpo usando un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo como un 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 anticuerpo anti-CAPRINA-1. En este contexto, el "epítipo" se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, preferentemente de 8 a 11 aminoácidos.

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

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

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

65 Para el anticuerpo humanizado, puede prepararse un ADN que codifica el anticuerpo humanizado produciendo ADN

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

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

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

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

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

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

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las regiones determinantes de la complementariedad CDR de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11 (por ejemplo, un anticuerpo que tiene una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y una región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12);

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

Los ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo monocatenario o el anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos descritos a continuación.

(i) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de anticuerpo humano y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de un anticuerpo humano.

(ii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco conservadas procedentes de un anticuerpo humano, una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano, una región variable de cadena ligera que

comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco procedentes de anticuerpo humano y una región constante de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpo humano.

5 (iii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8, una región constante de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano, una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, y una región constante de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de un anticuerpo humano.

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

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

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

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

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

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

Los ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las bibliografías, etc.; paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfano, pipsulfano, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptocina 1, criptocina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiostatina, clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorcarmicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frofínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona,

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

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

Los ejemplos del agente antitumoral usado en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfano, pipsulfano, benzodopa, carbocouona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilfosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatrina, clorambucilo, clornafazina, ciclofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirubicina, esorubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frofínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epitolona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de 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 estos agentes antitumorales, ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina se usan particularmente preferentemente.

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

<Efecto antitumoral>

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

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

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

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

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 con mayor afinidad de unión a una proteína CAPRINA-1 en la superficie de las células cancerosas ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por lo tanto, puede esperarse que el anticuerpos de acuerdo con la presente invención tenga un efecto antitumoral más fuerte debido a la alta afinidad de unión por la proteína CAPRINA-1 y, por tanto, se puede usar como una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento y/o prevención del cáncer. preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene una constante de afinidad de unión con la constante de asociación (constante de afinidad) K_a (k_{on}/k_{off}) de, preferentemente, al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$ o al menos $10^{13} M^{-1}$, como se ha descrito anteriormente.

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

<Unión a células que expresan antígenos>

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

<Tinción inmunohistoquímica>

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

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

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

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

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

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

Los ejemplos específicos de estos cánceres incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama de tipo complejo, tumor mixto maligno de glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer microcítico, cáncer macrocítico,

glioma que es tumor de tejido neuroepitelial,ependimoma ventricular, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de células pequeñas a medias, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transverso, cáncer de colon sigmoide, cáncer de recto, cáncer de ovarios
 5 epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromales, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia papilar-mucinoso intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, cistadenocarcinoma seroso, tumor papilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple de tipo-1 (síndrome de Wermer), tumor de células de los islotes no funcionales, somatostatinooma y VIPoma.

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

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

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

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

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

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

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

55 La composición farmacéutica que incluye el anticuerpo de la presente invención o fragmentos de la misma puede administrarse a un sujeto para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
 60

La presente invención abarca además medios para tratar y/o prevenir el cáncer, mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente o una composición farmacéutica que contiene dicho agente antitumoral a un sujeto. El
 65 anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo se puede administrar simultáneamente con el sujeto o por separado del agente antitumoral al sujeto. En el caso de la administración por separado de estas composiciones

farmacéuticas, cualquiera de ellas se puede administrar primero o después. Sus intervalos de dosificación, dosis, las vías de administración y el número de dosis pueden seleccionarse de manera adecuada por un especialista. Las otras formas de dosificación farmacéuticas para su administración simultánea incluyen también, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formuladas cada una mezclando el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo y el agente antitumoral en un vehículo (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores acerca de la composición, formulación, las vías de administración, dosis, cáncer, etc. referentes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que contienen el anticuerpo de la presente invención también pueden aplicarse a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen el agente antitumoral mencionadas anteriormente.

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

<Polipéptido y ADN>

La presente invención proporciona además un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención o el fragmento (fragmento de unión a anticuerpos) del mismo. El ADN puede ser un ADN que codifica las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo o puede ser un ADN que codifica las regiones variables de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo. El ADN puede ser también un ADN que codifica cada una o una combinación de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo. Un ADN de este tipo incluye, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada a que comprende las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera a que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10, y 11, en el caso del anticuerpo mencionado anteriormente (a).

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

Otros ejemplos del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluyen un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y un ADN que codifica una región variable de la cadena ligera a que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12. En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 13. Un ejemplo de las secuencias de nucleótidos que codifican la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12 es la secuencia de nucleótidos: de la SEQ ID NO: 14. Cuando dicho ADN comprende regiones que codifican regiones constantes de las cadenas pesada y ligera, cada una de las regiones comprende, preferentemente, una secuencia de nucleótidos que codifica una correspondiente secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano (secuencia de aminoácidos de cada región constante de las cadenas pesada y ligera).

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

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

(i) un polipéptido que comprende cualquier secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8 y 12, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende cualquiera de las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 13 y 14);

(iii) polipéptidos de la CDR de la cadena pesada seleccionados del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y un ADN que codifica los polipéptidos; y

(iii) polipéptidos de la CDR de la cadena ligera seleccionados de las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 9, 10 y 11, y un ADN que codifica los polipéptidos.

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

10 Ejemplos

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

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

Se investigó la expresión del gen de la CAPRINA-1 en tejidos normales de perro y ser humano y diversas líneas celulares por el método de RT-PCR de acuerdo con el ejemplo 1 (4) del documento WO2010/016526. Como resultado, se observó una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que la expresión se observó en cáncer de mama canino y tejidos de adenocarcinoma. Además, como resultado del examen de la expresión en tejidos humanos, la expresión se observó solo en el testículo entre tejidos normales, como con el gen CAPRINA-1 canino. En contraste, la expresión se detectó en muchos tipos de líneas celulares de cáncer, incluyendo 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1) y 4 líneas celulares de cáncer de páncreas (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPc-3), entre las células cancerosas. Estos resultados demostraron que la expresión de CAPRINA-1 no se encuentra en tejidos normales aparte del testículo, mientras que CAPRINA-1 se expresa en las líneas celulares de cáncer de mama.

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

100 µg de proteínas CAPRINA-1 humanas (que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2) preparadas en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 se mezclaron con una cantidad igual de adyuvante MPL + TDM (Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se usó como una solución de antígeno por ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (preparado por Japan SLC, Inc.). A continuación, se realizaron 7 administraciones cada 1 semana para completar la inmunización. Tres días después de la inmunización final, el bazo de cada ratón se escindió y se molió entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos para eliminar el sobrenadante se repitieron tres veces para obtener células del bazo. Los esplenocitos obtenidos se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas de la ATCC) en una proporción de 10:1. Se añadió a la mezcla celular una solución de PEG preparada mezclando 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, que se calentó a 37 °C, con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH) y luego se dejó reposar durante 5 minutos para la fusión celular. Después de la eliminación del sobrenadante mediante centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía 15 % de FBS suplementado con 2 % de equivalente de una solución HAT (Gibco) (medio selectivo HAT). Esta suspensión se sembró en quince placas de 96 pocillos (Nunc) a 100 µl/pocillo. Los esplenocitos y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo durante 7 días a 37 °C, CO₂ al 5 % para obtener hibridomas.

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

65 Se añadieron los hibridomas seleccionados a una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la

placa. Una semana después, se observaron los hibridomas que forman colonias únicas en los pocillos. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se sometieron a detección selectiva para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas frente a la proteína CAPRINA-1 como indicador. Una solución de 1 µg/ml de la proteína CAPRINA-1 preparada en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 se añadió a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de BSA al 0,5 % a 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se eliminó la solución en cada pocillo y se lavó cada pocillo tres veces con 400 µl de PBS-T. A continuación, se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a los mismos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos (H + L) IgG anti-ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del desarrollo del color, se terminó la reacción mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm con un espectrómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 112 líneas de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales reactivos con la proteína CAPRINA-1.

A continuación, se exploraron estos anticuerpos monoclonales respecto a los anticuerpos reactivos con la superficie de las células de cáncer de mama que expresan CAPRINA-1. Específicamente, se centrifugaron 10⁶ células de una línea celular de cáncer de mama humana MDA-MB-231 V en un tubo para microcentrifugación de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido anteriormente y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron a los mismos anticuerpos IgG de cabra anti-ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otro lado, se efectuó la misma operación que antes usando el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad diluido 500 veces con un medio para cultivo de hibridoma, en lugar de los anticuerpos, para preparar un control. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal (n.º 1) que tenían una intensidad de fluorescencia mayor que la del control, es decir, reactivo con la superficie de las células de cáncer de mama.

Ejemplo 3. Caracterización del anticuerpo monoclonal seleccionado

Los fragmentos de amplificación de genes que codifican las regiones variables de los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 2 se obtuvieron según un método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526 y se analizaron para sus secuencias de genes y secuencias de aminoácidos codificadas por el mismo. Como resultado, el anticuerpo monoclonal n.º 1 tenía regiones variables que consistían en la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12. La secuencia del gen que codificaba la región variable de la cadena pesada el anticuerpo monoclonal n.º 1 obtenido se muestra en la SEQ ID NO: 13 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia génica que codifica la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal n.º 1 obtenido se muestra en la SEQ ID NO: 14 y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 12.

En otras palabras, se descubrió que el anticuerpo monoclonal n.º 1 comprendía la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 8 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 12, en la que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 consistente en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 9, 10, y 11, respectivamente.

50 Ejemplo 4 Preparación de anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón

El fragmento de amplificación génica preparado en el Ejemplo 3 que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 13) de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 se trató en ambos extremos con una enzima de restricción, después se purificó y se insertó de acuerdo con un convencional en un vector pcDNA4/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de la cadena H de IgG₁ humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 37. Asimismo, el fragmento de amplificación génica que comprende la secuencia (SEQ ID NO: 14) de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 se trató en ambos extremos con una enzima de restricción, después se purificó y se insertó de acuerdo con un convencional en un vector pcDNA3.1/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de la cadena L de IgG₁ humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 38.

A continuación, el vector recombinante que tiene la inserción de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 13) del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 y el vector recombinante que tiene la inserción de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 14) del anticuerpo monoclonal de ratón n.º 1 se introdujeron en células CHO-K1

(obtenidas en Riken Cell Bank). Específicamente, se cultivaron 2×10^5 células CHO-K1 en un medio F12 de Ham (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo en una placa de cultivo de 12 pocillos y se lavaron con PBS(-). A continuación, se añadió un medio F12 de Ham fresco que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores en 30 μ l de OptiMEM (fabricado por Invitrogen Corp.) con 30 μ l de reactivo de transfección Polyfect (fabricado por Qiagen N.V.) y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 cotransfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 % suplementado con 200 μ g/ml de Zeocin (fabricado por Invitrogen Corp.) y 200 μ g/ml de geneticina (fabricado por Roche Diagnostics KK) y, después, se sembraron en una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo para preparar una línea celular que produce de forma estable un anticuerpo monoclonal n.º 1 (n.º 1) quimérico humano-de ratón que tiene las regiones variables del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón.

Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm² a una densidad de 5×10^5 células/ml en 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían los respectivos anticuerpos monoclonales, comparativos quiméricos de humano-ratón n.º 1.

Asimismo, se prepararon líneas celulares que producían de forma estable anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos de humano - ratón 1 a 11 de la misma manera que anteriormente, respectivamente, sobre la base de los siguientes anticuerpos monoclonales derivados de ratón anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2010/016526 como anticuerpos comparativos: un anticuerpo comparativo 1 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 15 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 16; un anticuerpo comparativo 2 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 17 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 18; un anticuerpo comparativo 3 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 19 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 20; un anticuerpo comparativo 4 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 21 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 22; un anticuerpo comparativo 5 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 23 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 24; un anticuerpo comparativo 6 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 25 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 26; un anticuerpo comparativo 7 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 27 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 28; un anticuerpo comparativo 8 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 29 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 30; un anticuerpo comparativo 9 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 31 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 32; un anticuerpo comparativo 10 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 33 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 34; y un anticuerpo comparativo 11 que tiene una región variable de la cadena pesada de SEQ ID NO: 35 y la región variable de la cadena ligera de SEQ ID NO: 36. Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm² a una densidad de 5×10^5 células/ml en 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían los respectivos anticuerpos comparativos quiméricos de ser humano-ratón 1 a 11.

Ejemplo 5 Análisis de expresión de CAPRINA-1 en la superficie de varias células cancerosas usando anticuerpo anti-CAPRINA-1 n.º 1

A continuación, se examinaron líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1), las líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la línea celular de cáncer de ovarios (SKOV3), las líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las líneas celulares cáncer de páncreas (Capan-2 y MIAPaCa-2), la línea celular de cáncer de próstata (PC3), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las líneas celulares de tumores cerebrales (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), las líneas celulares de cáncer gástrico (MNK28 y MNK45), las líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Lovo, Lovo, CaCo2, SW480, y HCT116), la línea celular de leucemia (AML5) y la línea celular de linfoma (Ramos) que se observó que tenían expresión del gen CAPRINA-1 se examinó en cuanto a su expresión de proteínas CAPRINA-1 en la superficie celular usando los sobrenadantes de cultivo que contenían el n.º 1 obtenido en el Ejemplo 2. Se centrifugaron 5×10^5 de cada línea celular cada una en un tubo de microcentrifugación de 1,5 ml. Se añadió al tubo un sobrenadante de cultivo (100 μ l) que contenía el anticuerpo n.º 1 y se dejó reposar durante 1 hora sobre hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos IgG de cabra anti-ratón (H + L) marcados con FITC (fabricados por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejaron reposar a 4 ° C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo utilizado fue células que han reaccionado solo con anticuerpos secundarios. Como resultado, las células tratadas con el anticuerpo n.º 1 tenían una intensidad de fluorescencia al menos un 35 % más fuerte que la del control negativo. Esto demostró que las proteínas CAPRINA-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. Las velocidades de mejora en la intensidad de fluorescencia se expresaron como las velocidades de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en las líneas celulares respectivas, que se calculan de acuerdo con la siguiente fórmula.

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

Ejemplo 6 Efecto antitumoral (actividad ADCC) del anticuerpo anti-CAPRINA-1 en células cancerosas

Se examinó el anticuerpo monoclonal quimérico 1 anti - CAPRINA - 1 humano - de ratón obtenido en el Ejemplo 4 para determinar si tiene la capacidad de dañar células cancerosas que expresan CAPRINA - 1 determinando la actividad de ADCC. El sobrenadante del cultivo de una línea celular que produce el n.º 1 se purificó usando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare BioSciences Ltd.). Tras la sustitución con PBS(-), se filtró la solución a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se usó para el ensayo de actividad. Se recogieron 10⁶ células de la línea celular cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y de la línea celular de cáncer de pulmón QG56 que se observó que tenían expresión de CAPRINA-1 cada una en un tubo de centrifuga de 50 ml y, a continuación, se añadieron al mismo 100 µCi de cromo 51, seguido de incubación a 37°C durante 2 horas. A continuación, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía 10 % de FBS y se añadieron a 2 x 10³ células/pocillo a una placa de fondo en V de 96 pocillos para preparar las células diana. El anticuerpo purificado n.º 1 y los anticuerpos comparativos quiméricos de ratón humano 1 a 11 obtenidos en el Ejemplo 4 se añadieron cada uno a 1 µg/pocillo. Se añadió a la placa una población celular que contenía células NK humanas separadas usando un método convencional de linfocitos de sangre periférica humana a 2 x 10⁵ células/pocillo y cultivadas durante 4 horas a 37 °C, CO₂ al 5 %. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberada de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRINA-1 contra las células cancerosas. El control negativo utilizado fue células tratadas con anticuerpos de control de isotipo. La población celular que contenía células NK que se usó en esta evaluación se preparó de la siguiente manera: células mononucleares de sangre periférica humana separadas de sangre periférica según un método convencional usando una solución de separación de gravedad específica Histopaque para separación de células mononucleares de sangre periférica humana (Sigma-Aldrich Corp.) se hicieron reaccionar con varios anticuerpos marcados con pigmento fluorescente FITC (anticuerpo anti-CD3 humano, anticuerpo anti-CD20 humano, anticuerpo anti-CD19 humano, anticuerpo anti-CD11c humano y anticuerpo anti-HLA-DR (Becton, and Dickinson and Company)); y se separó una población celular sin teñir con los anticuerpos utilizando un clasificador de células (FACS Vantage SE (Becton, and Dickinson and Company)) o se separó una población de células con un kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec KK). Como resultado de evaluar la actividad citotóxica contra las células cancerosas, los anticuerpos de control de isotipo usados y los anticuerpos comparativos 1 a 11 utilizados tuvieron actividad citotóxica inferior al 5 % contra toda la línea celular de cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2, y la a línea celular de cáncer de pulmón humano QG56. En contraste, el anticuerpo n.º 1 exhibió actividad citotóxica del 26 %, un 17 %, un 29%, 23 %, y 11 % contra la línea de células de cáncer de mama humano MCF7, la línea celular de cáncer colorrectal humano HCT-116, la línea celular de cáncer pancreático humano MIAPaCa-2, la línea celular de cáncer de riñón humano Caki-2 y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, respectivamente. De forma análoga, los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos comparativos 1 a 11 utilizados tenían actividad citotóxica inferior al 4 % frente a todas las otras células cancerosas, líneas celulares de cáncer de mama ZR75-1, T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231V y MRK-nu-1, líneas celulares de glioma T98G y U373, una línea celular de cáncer de pulmón A549, líneas celulares de cáncer de riñón Caki-1 y ACHN, una línea celular de cáncer de cuello uterino SW756, una línea celular de cáncer de Vejiga urinaria T24, líneas celulares de cáncer gástrico MKN28 y MKN45, una línea celular de cáncer colorrectal SW480, una línea celular de leucemia AML5 y una línea celular de linfoma Ramos. En contraste, e observó que el anticuerpo n.º 1 tenía una actividad citotóxica del 10 % o superior contra estas líneas celulares. stos resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal n.º 1 contra CAPRINA-1 daña las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 a través de su actividad ADCC, y se demostró que el anticuerpo n.º 1 muestra una actividad citotóxica más fuerte contra las células cancerosas humanas que los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Estos resultados se obtuvieron mediante la determinación de la actividad citotóxica mediante, como se ha descrito anteriormente, mezclando el anticuerpo anti-CAPRINA-1 usado en la presente invención, los linfocitos (población celular que contiene células NK) y 2 x 10³ células de cada línea celular de cáncer con cromo 51 incorporado, cultivando las células durante 4 horas; después del cultivo, medir la cantidad de cromo 51 liberada en el medio; y calculando la actividad citotóxica contra cada línea celular de cáncer de acuerdo con la siguiente fórmula*.

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

A continuación, se evaluó el anticuerpo monoclonal quimérico humano-ratón n.º 1 obtenido en el ejemplo 4 con respecto a su efecto antitumoral en ratones portadores de cáncer *in vivo*. El anticuerpo n.º 1 utilizado se purificó en columna a partir del sobrenadante de cultivo de cada línea celular productora del anticuerpo n.º 1. De manera similar, los anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-ratón 1 a 11 preparados en el Ejemplo 4 también se evaluaron con respecto a sus efectos antitumorales en ratones con cáncer *in vivo*.

Específicamente, el anticuerpo n.º 1 se examinó para determinar su efecto antitumoral usando ratones portadores de cáncer en los que se trasplantó una línea celular de cáncer derivada de ser humano que expresa CAPRINA-1. La

línea celular de cáncer de páncreas humano células Capan-2 (adquirida de la ATCC) se trasplantó por vía subcutánea a 2×10^6 células por ratón en las espaldas de 65 ratones Balb/c desnudos (fabricados por Japan SLC, Inc.) y se cultivaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 5 mm de diámetro. El anticuerpo n.º 1 y los anticuerpos comparativos quiméricos humanos-ratón 1 a 11 se administraron intraperitonealmente a una dosis de 200 µg (200 µl)/ ratón a 5 animales (por anticuerpo) del ratón portador de cáncer. A continuación, cada anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones portadores de cáncer a la misma dosis que la anterior un total de tres veces durante 2 días. El tamaño del tumor se midió todos los días para evaluar el efecto antitumoral. Por otro lado, se administró PBS (-) en lugar de los anticuerpos a los 5 animales restantes del ratón portador de cáncer, como grupo de control. El tamaño del tumor (volumen) se calculó de acuerdo con la fórmula: $0,5 \times (\text{eje mayor} \times \text{eje menor} \times \text{eje menor})$.

Como resultado del ensayo del efecto antitumoral, en el grupo de prueba que recibió el anticuerpo n.º 1 contra CAPRINA-1, el crecimiento tumoral se suprimió al 68 % el día 29 después de la administración del anticuerpo en relación con el grupo de control en términos del tamaño del tumor en la misma fecha (definida como 100 %). En contraste, en los ratones que recibieron los anticuerpos comparativos quiméricos de ratón humano 1 a 11, el crecimiento tumoral se suprimió a aproximadamente el 85 %. Estos resultados demostraron que el anticuerpo n.º 1 anti-CAPRINA-1 obtenido ejerce *in vivo* un efecto antitumoral sobre las células cancerosas que expresan CAPRINA-1. Los resultados también demostraron que el anticuerpo n.º 1 ejerce *in vivo* un efecto antitumoral más fuerte que el de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Ejemplo 7 El número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie de varias células cancerosas reconocidas por los anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 n.º 1

Se examinaron las líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1), las líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer de ovarios (SKOV3), las líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), las líneas celulares de cáncer de páncreas (MIAPaCa-2 y Capan-2), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las líneas celulares de tumores cerebrales (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373), las líneas celulares de cáncer gástrico (MKN28 y MKN45), las líneas celulares de cáncer colorrectal (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116), una línea celular de leucemia (AML5) y una línea celular de linfoma (Ramos) se examinaron usando QIFIKIT, un kit de ensayo para el número de moléculas (fabricadas por Dako Japan Inc.) para el número de moléculas de CAPRINA-1 en su superficie celular reconocido por el anticuerpo N.º1 anti-CAPRINA-1. De manera similar, el número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie de estas diversas células cancerosas también se examinó usando los anticuerpos comparativos 1 a 11, que son anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 preparados en el Ejemplo 4.

De acuerdo con el protocolo adjunto al kit, el anticuerpo n.º 1 y los anticuerpos comparativos 1 a 11 se diluyeron en 5 µg/ml a concentración final con PBS, y esta dilución se añadió a cada línea celular y se hizo reaccionar durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, los anticuerpos IgG anti-ratón marcados fluorescentemente unidos al kit se añadieron como anticuerpos secundarios, junto con perlas de calibración unidas al kit, a cada línea celular y se dejaron reposar durante 45 minutos en hielo. Cada línea celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. A continuación, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) para obtener un valor medio de intensidad de fluorescencia (media). Además, la intensidad de la fluorescencia también se midió usando anticuerpos comparativos de forma similar a la anterior para obtener una media. El control negativo utilizado fue células que reaccionaron con los anticuerpos de control de isotipo y también se obtuvo una media. Cada valor de intensidad de fluorescencia media (media) se utilizó para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie de varias células cancerosas reconocidas por el anticuerpo n.º 1 fue 10^5 o más por célula para todas las líneas celulares de cáncer humano examinadas. Por otro lado, el número de moléculas reconocidas por los anticuerpos comparativos 1 a 11 fue inferior a 10^5 por célula.

Aplicabilidad industrial

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

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

<130> PH-5300-PCT

<150> JP 2011-171332

<151> 04/08/2011

ES 2 660 115 T3

<160> 38

<170> PatentIn versión 3.1

5 <210> 1
 <211> 5562
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (190)..(2319)
 <223>

15 <400> 1

```

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 660 115 T3

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

ES 2 660 115 T3

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

ES 2 660 115 T3

Asn	Gly	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly		
		625					630					635					
tac	cgc	cct	tca	ttc	tct	aac	act	cca	aac	agt	ggc	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	ggccagtgta	ccataatatg	ttaccagaag	agttattatc	tatttgttct												2409
ccctttcagg	aaacttattg	taaagggact	gttttcatcc	cataaagaca	ggactacaat												2469
tgtcagcttt	ctattacctg	gatatggaag	gaaactat	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	atctccctag	aaaggaagat	gaaaggagtg	gagtgtggtt												2769
tggcagaaca	actgcatttc	acagcttttc	cagttaaatt	ggagcactga	acgttcagat												2829
gcataccaaa	ttatgcatgg	gtcctaataca	cacatataag	gctggctacc	agctttgaca												2889
cagcactggt	catctggcca	aacaactgtg	gttaaaaaca	catgtaaaat	gctttttaac												2949
agctgatact	gtataagaca	aagccaagat	gcaaaattag	gctttgattg	gcactttttg												3009
aaaaatatgc	aacaaatag	ggatgtaatc	cggatggccg	cttctgtact	taatgtgaaa												3069
tatttagata	cctttttgaa	cacttaacag	tttctttgag	acaatgactt	ttgtaaggat												3129
tggtactatc	tatcattcct	tatgacatgt	acattgtctg	tcactaatcc	ttggattttg												3189
ctgtattgtc	acctaaattg	gtacaggtac	tgatgaaaat	ctctagtggg	taatcataac												3249
actctcggtc	acatgttttt	ccttcagctt	gaaagctttt	ttttaaaagg	aaaagatacc												3309
aatgcctgc	tgctaccacc	cttttcaatt	gctatctttt	gaaaggcacc	agtatgtgtt												3369
ttagattgat	ttccctgttt	cagggaaatc	acggacagta	gtttcagttc	tgatggtata												3429
agcaaaacaa	ataaaacgtt	tataaaagtt	gtatcttgaa	acactggtgt	tcaacagcta												3489
gcagcttatg	tgattcacc	catgccacgt	tagtgtcaca	aattttatgg	tttatctcca												3549

ES 2 660 115 T3

gcaacatttc tctagtaact gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609
ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc cttcccttag atgcataggg 3669
agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729
ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789
tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849
taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattcctt 3909
ccagtaggtg ctcagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969
tgagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctggtgaac attccacatt 4029
caaaagtfff gtaggggtggg gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089
aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtggtac atcatattgg aagggttaac 4149
ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgctg gctttaaata 4209
catctgcctg ggatgtacca caaccatag ttacctgat cttaggggaa tggataaaat 4269
atgtgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329
atgtgctatc tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc 4389
ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449
gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaagggtg tcatagtttg 4509
actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaactat aatttttctt 4569
tttttggtta ttttaccatc acagtttaaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629
tatttttaaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689
ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749
ccttttgttt ggtcaaatgc atatttttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809
tcaactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869
taaatcatct catgtggata tgaaacttct ttttttaaac ttaaaaagggt agaatgttat 4929
tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989
aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049
atcagttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109
ttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaaggttcat taactgaggt 5169
gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttcctaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229
atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289
tcattttatg tttaaactcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa 5349
attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgcccttgat cttgtccttt 5409
ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469

ES 2 660 115 T3

tcttcataacc tttttccatt ttgaatccta caaaaataact gcaaaaagact agtgaatggt 5529

taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

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

5

<400> 2

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

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

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

Val Gln Thr Glu Ala Met Lys 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

10

ES 2 660 115 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 2 660 115 T3

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

ES 2 660 115 T3

Thr Gln Gln Val Asn
705

5 <210> 3
<211> 3553
<212> ADN
<213> Homo sapiens

10 <220>
<221> CDS
<222> (190)..(2274)
<223>

15 <400> 3

ES 2 660 115 T3

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgcctca ctaggagcgg	60
ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgcccc 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 Pro Ser Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
15 20 25 30	
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
35 40 45	
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
50 55 60	
aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	
ata aag aag aca gca cgt ccg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa	615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu	
130 135 140	
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa	663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys	
145 150 155	
ttg gga gat gat gaa gtg ccg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga	711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly	

ES 2 660 115 T3

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

ES 2 660 115 T3

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

ES 2 660 115 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 2 660 115 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

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

<400> 5

10 Ala Tyr Ser Met His
 1 5

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

<400> 6

ES 2 660 115 T3

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

Gly

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

<400> 7

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

<210> 8
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

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

<400> 9

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

ES 2 660 115 T3

<210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Mus musculus
 <400> 10

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 1 5

10 <210> 11
 <211> 9
 <212> PRT
 15 <213> Mus musculus
 <400> 11

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr
 1 5

20 <210> 12
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 12

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

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

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

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

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

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

Tyr Cys Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr Ser Glu Gly Asp Gln
 100 105 110

Ala Glu Ile Lys Leu Ala
 115

30 <210> 13
 <211> 342
 <212> ADN

ES 2 660 115 T3

<213> Mus musculus

<400> 13

ggatttgagc tgaagaagcc tggagagaca gtcaagatct cctgcaaggc ttctggttat 60
 accttcacag cctattcaat gcactgggtg aagcagactc caggaaaggg tttaaagtgg 120
 ctgggctgga taaacactga gactgggtgag ccaacatata cagatgactt caagggacgg 180
 tttaccttct ctttggaaac ctctgccagg attgcctatt tgcagatcaa cgacctcaaa 240
 aacgaggaca cggctacata tttctgtgct agaaggatct attacttcgg tagaggtggg 300
 5 tttgactact ggggccaaag gaccacggtc accgtctcct ca 342

<210> 14

<211> 354

<212> ADN

10 <213> Mus musculus

<400> 14

cctgcttcca gcagtgatgt tttgatgacc caaactcctc tctccctgcc tgtccgtctt 60
 ggagatcagt cctccatctc ttgcagatct agtcagtcca ttgtacatag taatggaaac 120
 acctatntag aatggtacct gcagaaacca ggccagtctc caaagctcct gatctacaaa 180
 gttccaacc gattttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggatc agggacagat 240
 ttcacactca agatcagcag agtggagcct gaggatctgg gagtttatta ctgctttcag 300
 15 ggttcacatg ttccgtacac gtcggagggg gaccaagctg aaataaaatt ggcc 354

<210> 15

<211> 148

<212> PRT

20 <213> Mus musculus

<400> 15

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
 145

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

5

<400> 16

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
 145

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

<400> 18

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

5

10

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Asn Arg
 130

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

5

<400> 19

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 660 115 T3

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
 145

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

5

<400> 20

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

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

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

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

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

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

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

Ile Lys Gln Ser Asp
 115

10

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

15

<400> 21

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
145

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

5

<400> 22

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

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

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

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

10

ES 2 660 115 T3

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

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

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

5

<400> 23

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
 145

10

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

15

<400> 24

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Lys
 100

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

5

<400> 26

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

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

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

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

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

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

10

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

15

ES 2 660 115 T3

<400> 27

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

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

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

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

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

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

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

Val Ser Ser Asn
 115

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

10 <400> 28

ES 2 660 115 T3

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

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

5

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

10

ES 2 660 115 T3

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

5

<400> 30

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

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

15 <400> 31

Pro Arg Ala Ser Leu Gly Val Ser Glu Thr Leu Leu Cys Thr Ser Gly
 1 5 10 15
 Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly
 20 25 30

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

5 <210> 32
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 32

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

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

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

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

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

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

15 <210> 33
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 33

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<400> 34

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Trp Lys Ser Asn
 100

10

ES 2 660 115 T3

5 <210> 35
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 35

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

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

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

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

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

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

Thr Val Ser Ser Lys
 100

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

15 <400> 36

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

Ser Asn Lys

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

<400> 37

5

ES 2 660 115 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

ES 2 660 115 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210> 38
<211> 106
5 <212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

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

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

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

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

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

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

10

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1 y comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 9, 10 y 11.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
- 15 3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.
- 20 4. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
- 25 5. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
- 30 6. Una composición farmacéutica, que comprende como principio activo el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en un método de tratamiento y/o prevención del cáncer.
8. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 7, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
9. Un ADN que codifica el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.