

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 695**

51 Int. Cl.:

C12N 15/09 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
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/JP2012/069853**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.02.2013** **WO13018891**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012** **E 12820091 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2740794**

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

30 Prioridad:

04.08.2011 JP 2011171377

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

15.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OKANO FUMIYOSHI;
KOBAYASHI SHINICHI;
MINAMIDA YOSHITAKA y
SAITO TAKANORI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 672 695 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición farmacéutica para el tratamiento y/o la profilaxis del cáncer

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere al uso 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, como se especifica en las reivindicaciones.

10 **Técnica antecedente**

El cáncer es la principal causa de muerte. Actualmente, 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 existente del cáncer tiene un resultado insuficientemente mejorado, excepto en algunos tipos de cáncer. Con los avances recientes de la biología molecular o la inmunología del cáncer, se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente con el cáncer, antígenos cancerosos que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, genes que codifican dichos antígenos cancerosos y similares, elevando las expectativas sobre la terapia específica contra el cáncer dirigida a antígenos cancerosos (bibliografía no de patente 1).

Para reducir el efecto secundario de la terapia contra el cáncer, es deseable que los péptidos, polipéptidos o proteínas reconocidos como antígenos del cáncer rara vez existan en las células normales y existan específicamente en las células cancerígenas. En 1991, Boon y *col.*, (Ludwig Institute for Cancer Research, Bélgica) aislaron un antígeno de melanoma humano MAGE1 reconocido por linfocitos T CD8 positivos mediante un método de clonación de expresión de ADNc usando líneas de células cancerosas autólogas y linfocitos T reactivos con cáncer (bibliografía no de patente 2). A continuación, se indicó un método SEREX (identificación serológica de antígenos mediante clonación de expresión recombinante), que adopta un enfoque de clonación de expresión génica para identificar antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos producidos en respuesta al cáncer autólogo *in vivo* en un paciente con cáncer (bibliografía no de patente 3 y bibliografía de patente 1). De acuerdo con este método, se han aislado algunos antígenos cancerosos que rara vez se expresan en células normales y se expresan específicamente en cáncer (bibliografía no de patente 4 a 9). Además, la terapia celular que usa inmunocitos que reaccionan específicamente con antígenos cancerosos o la inmunoterapia específica para el cáncer usando vacunas o similares que comprenden antígenos cancerosos está bajo ensayo clínico dirigido a algunos de los antígenos cancerosos aislados.

En los últimos años han surgido en el mundo diversos fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer dirigidos a las proteínas antigénicas en las células cancerosas. Estos fármacos han recibido atención debido a su determinada eficacia como agentes terapéuticos específicos para el cáncer. Sin embargo, una gran mayoría de las proteínas antigénicas dirigidas por los fármacos, también se expresan en células normales. Como resultado de la administración de los anticuerpos, las células normales que expresan los antígenos así como las células cancerosas se dañan, dando como resultado, de manera desventajosa, un efecto secundario. Por tanto, si se pueden identificar los antígenos cancerosos expresados específicamente en la superficie de las células cancerosas y se pueden usar los anticuerpos dirigidos a los antígenos como fármacos, se puede esperar que estos fármacos de anticuerpos consigan un tratamiento con menos efectos secundarios.

La proteína 1 (CAPRIN-1) asociada a la proliferación y la activación citoplásmica se conoce como una proteína intracelular que se expresa tras la activación o la división celular de células normales en reposo y forma gránulos de estrés citoplásmico con ARN intracelulares para participar en la regulación del transporte y traducción de ARNm. Se ha encontrado que esta proteína se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y, por lo tanto, se está estudiando como objetivo de los fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer (bibliografía de patente 2).

Lista de citas

55 **Bibliografía de patente**

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

Bibliografía de patente 2: documento WO2010/016526

60 **Bibliografía no de patente**

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

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

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

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

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

Sumario de la invención

Problema técnico

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

Solución al problema

La presente invención tiene los siguientes aspectos:

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1, comprendiendo el anticuerpo o fragmento del mismo una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOs: 5, 6 y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOs: 9, 10 y 11.

En otra realización, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo biespecífico.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o el fragmento del mismo como principio activo, y una combinación farmacéutica como se define en las reivindicaciones. La invención también proporciona dichas composición farmacéutica y dicha combinación farmacéutica, cada una para su uso en un método para tratar y/o evitar el cáncer.

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

Efectos ventajosos de la invención

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

Descripción de las realizaciones

El anticuerpo contra un polipéptido CAPRIN-1 usado en la presente invención se puede examinar para determinar su actividad antitumoral, como se describe más adelante, examinando *in vivo* la inhibición de la proliferación tumoral en un animal portador de cáncer o examinando *ex vivo* la presencia o la ausencia de actividad citotóxica mediada por inmunocitos o complemento mostrada por el anticuerpo contra células tumorales que expresan el polipéptido.

El anticuerpo contra CAPRIN-1 usado en la presente invención es un anticuerpo monoclonal que se une específicamente a la proteína CAPRIN-1. Dicho anticuerpo monoclonal puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda ejercer actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, anticuerpos de animales no humanos (*p. ej.*, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, conejo y pollo), anticuerpos recombinantes (*p. ej.*, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos y anticuerpos monocatenarios (scFv)), anticuerpos humanos y sus fragmentos de anticuerpos (*p. ej.*, Fab, F(ab')₂ y Fv). Estos anticuerpos y sus fragmentos se pueden preparar mediante los métodos generalmente conocidos por los expertos en la técnica. En el caso de un sujeto humano, es deseable un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir el rechazo.

El anticuerpo es una clase de molécula de inmunoglobulina, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA, IgD o IgY o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

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

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

El sujeto para 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.

- 5 En lo sucesivo en el presente documento, se describirá la preparación del antígeno, la preparación del anticuerpo y una composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

<Preparación del antígeno para la preparación del anticuerpo>

- 10 Las proteínas o fragmentos de las mismas usados como antígenos sensibilizantes para obtener el anticuerpo contra CAPRIN-1 usado en la presente invención no están limitados por los tipos de animales que sirven como sus orígenes, incluyendo seres humanos, perros, ganado bovino, caballos, ratones, ratas y pollos. Las proteínas o los fragmentos de las mismas, sin embargo, se seleccionan preferentemente en vista de la compatibilidad con las células parentales para su uso en la fusión celular. En general, se prefieren las proteínas procedentes de mamíferos.
- 15 En particular, se prefieren las proteínas procedentes de seres humanos. Por ejemplo, cuando CAPRIN-1 es CAPRIN-1 humana, las proteínas humanas CAPRIN-1, sus péptidos parciales o las células que expresan CAPRIN-1 humana pueden usarse como antígenos sensibilizantes.

- 20 Las secuencias de nucleótidos y las secuencias de aminoácidos de la CAPRIN-1 humana y sus homólogos se pueden obtener, por ejemplo, creando un acceso a GenBank (NCBI, EE.UU.) y usando el algoritmo BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU., 90: 5873-5877, 1993; y Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997).

- 25 En la presente invención, con referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 o 3) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 o 4) de CAPRIN-1 humana, los objetivos son ácidos nucleicos o proteínas que consisten en secuencias que tienen 70 % a 100 %, preferentemente 80 % a 100 %, más preferentemente 90 % a 100 %, aún más preferentemente 95 % a 100 %, por ejemplo, 97 % a 100 %, 98 % a 100 %, 99 % a 100 %, o una identidad de secuencia del 99,5 % al 100 % con la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos de la ORF o la porción madura de la referencia. En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un
- 30 porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos al número total de aminoácidos (o bases) cuando dos secuencias están alineadas de manera que el grado máximo de la similitud o identidad se puede conseguir con o sin huecos introducidos.

- 35 Los fragmentos de cada proteína CAPRIN-1 tienen longitudes que oscilan entre la longitud de aminoácidos de un epítipo (o un determinante antigénico), que es la unidad más pequeña reconocida por el anticuerpo, y 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, 8 a 11 aminoácidos.

- 40 Los polipéptidos que comprenden las proteínas CAPRIN-1 humanas anteriores y sus péptidos parciales se pueden sintetizar de acuerdo con métodos de síntesis química, por ejemplo, métodos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza (Curso de Experimentación Bioquímica en Inglés) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokio Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). Además, estos polipéptidos se pueden sintetizar mediante métodos habituales usando
- 45 diversos sintetizadores de péptidos disponibles en el mercado. Como alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse usando enfoques de ingeniería genética conocidos en la técnica (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, Un compendio de Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) y se incorporan en vectores de expresión, que luego
- 50 se introducen en las células huésped de modo que las células huésped produzcan los polipéptidos. De este modo, pueden obtenerse los polipéptidos de interés.

- Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar fácilmente mediante enfoques de ingeniería genética conocidos en la técnica o métodos habituales usando sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el
- 55 mercado. Por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos del gen CAPRIN-1 humano se puede preparar mediante RCP usando una biblioteca de ADN o ADNc cromosómico humano como molde y un par de cebadores diseñados para poder amplificar la secuencia de nucleótidos descrita en la SEQ. ID NO: 1. Las condiciones de reacción para esta RCP pueden determinarse de manera adecuada. Ejemplos de las condiciones pueden incluir, pero sin limitación, 30 ciclos cada uno que implican etapas de reacción que consisten en 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante 30 segundos a 1 minuto (hibridación), y 72 °C durante 2 minutos (elongación) usando ADN polimerasa de termotolerancia (*p. ej.*, Taq polimerasa, Pfu polimerasa) y un tampón de RCP que contiene Mg²⁺, seguido de reacción a 72 °C durante 7 minutos. El enfoque de RCP, las condiciones, etc. se describen, por ejemplo, en Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, Un compendio de Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (en particular, el
- 65 capítulo 15).

Además, se pueden preparar sondas o cebadores adecuados basándose en la información sobre las secuencias de nucleótidos del gen CAPRIN-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRIN-1, y se pueden usar en el tamizaje de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, dicha biblioteca de ADNc se produce a partir de células, órganos o tejidos que expresan proteínas CAPRIN-1. 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 de páncreas y cáncer de intestino grueso. Estas operaciones, incluida la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, el tamizaje de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidos por los expertos en la técnica y se pueden realizar de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Sambrook y *col.*, Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), y Ausubel y *col.*, (ibídem.). Los ADN que codifican las proteínas humanas CAPRIN-1 y sus péptidos parciales se pueden obtener a partir del ADN así obtenido.

Las células huésped pueden ser cualquier célula que pueda expresar los polipéptidos anteriores. Ejemplos de células procariotas incluyen, pero sin limitación, *E. coli*. Ejemplos de células eucariotas incluyen, pero sin limitación: células de mamíferos tales como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una línea celular HEK293 de riñón embrionario humano; una línea celular NIH3T3 de piel embrionaria de ratón; células de levadura tales como levadura en gemación y células de levadura de fisión; células de gusano de seda; y óvulos de *Xenopus*.

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

En el caso de usar células eucariotas como células huésped, se usan vectores de expresión para células eucariotas que tienen un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición de poli(A), etc. como vectores de expresión. Ejemplos de dichos vectores de expresión pueden incluir vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que antes, los ADN que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión con los que las células huésped eucariotas se transforman a continuación, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de modo que los polipéptidos codificados por los ADN se expresen en las células huésped eucariotas. En el caso de usar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, los polipéptidos pueden expresarse como diversas proteínas de fusión marcadas con la etiqueta His (*p. ej.*, (His)₆-(His)₁₀), etiqueta FLAG, etiqueta myc, etiqueta HA, GFP, o similares.

Los vectores de expresión se pueden introducir 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, infección viral, lipofección y unión con péptidos que penetran en la célula.

El polipéptido de interés se puede aislar y purificar a partir de las células huésped mediante una combinación de operaciones de separación conocidas en la técnica. Ejemplos de las mismas incluyen, pero sin limitación, tratamiento con un desnaturalizante (*p. ej.*, urea) o un detergente, ultrasonidos, digestión enzimática, precipitación de proteínas por adición de sal, fraccionamiento y precipitación del disolvente, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de enfoque isoeléctrico, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.

<Estructura del anticuerpo>

Generalmente, los anticuerpos son glicoproteínas heteromultiméricas que comprenden al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas distintas de 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 conectada a una cadena pesada a través de un único enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre cadenas pesadas varía entre diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesadas y ligeras también tiene un enlace disulfuro intracatenario. 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 sola región constante en el otro extremo. La región constante de la cadena ligera está alineada con la primera región constante de la cadena pesada, mientras que el dominio variable de la cadena ligera está alineado con el dominio variable de la cadena pesada. Las regiones particulares denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables del anticuerpo muestran variabilidad específica y transmiten especificidad de unión al anticuerpo. Las porciones relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables completos de cadena pesada y ligera comprenden cada uno cuatro FR conectadas a través de

tres CDR. Estas tres CDR se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la cadena pesada. Análogamente, las CDR se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR en cada cadena se mantienen cercanas entre sí por 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 diversas funciones efectoras, por ejemplo, implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fcγ, tasa de semivida/eliminación mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada del complemento.

<Preparación del anticuerpo>

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

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo que se une al antígeno CAPRIN-1 *in vivo*. A través de dicha unión, el anticuerpo ejerce la función de dañar (*p. ej.*, matar, suprimir o retroceder) el tumor. Específicamente, el anticuerpo usado en la presente invención no está limitado por su tipo siempre que el anticuerpo pueda dañar tumores tales como cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma como resultado de la unión a la proteína CAPRIN-1.

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 CAPRIN-1 se administran a cada ratón para la inmunización. El bazo se extrae de este ratón. Después de la separación de las células esplénicas, las células se fusionan con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto antiproliferativo de una célula cancerosa se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridomas). Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto antiproliferativo de una célula cancerosa se aíslan y se cultivan. El anticuerpo de interés se puede preparar por purificación del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un método de purificación por afinidad general.

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, de la siguiente manera: en primer lugar, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes de acuerdo con un método conocido en la técnica. Este método de inmunización generalmente implica la inyección intraperitoneal o subcutánea de los antígenos sensibilizantes a los mamíferos. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen con o se suspenden en PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica o similar en una cantidad adecuada y luego se mezclan, si se desea, con una cantidad adecuada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante completo de Freund. Después de la emulsificación, la emulsión resultante se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 21 días. Como alternativa, se puede usar un portador adecuado para la inmunización con antígenos sensibilizantes.

Después de la confirmación de un aumento en el nivel del anticuerpo deseado en el suero del mamífero así inmunizado, los inmunocitos se recogen del mamífero y se someten a fusión celular. Ejemplos preferentes de los inmunocitos incluyen particularmente células esplénicas.

Las células de mieloma de mamíferos se usan como células parentales asociadas para fusionarse con los inmunocitos. Diversas líneas celulares conocidas en la técnica, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (temas actuales en microbiología e inmunología (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, DH y col., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. y col., Nature (1978) 276, 269-270), FO (deSt. Groth, SF y col., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), SS194 (Trowbridge, IS J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), y R210 (Galfre, G. y col., Nature (1979) 277, 131-133), se usan preferentemente como células de mieloma.

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).

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, se usa polietilenglicol (PEG) o virus hemaglutinante de Japón (HVJ) como el promotor de fusión. Si se desea, se puede añadir adicionalmente un auxiliar tal como dimetilsulfóxido con el fin de potenciar la eficacia de la fusión.

La relación entre los inmunocitos y las células de mieloma usadas puede establecerse arbitrariamente. Por ejemplo,

la cantidad de los inmunocitos se ajusta preferentemente de 1 a 10 veces la cantidad de células de mieloma. Ejemplos del medio que puede usarse en la fusión celular incluyen 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, se puede usar un suplemento de suero tal como suero de ternera fetal (FCS) en combinación con estas células.

Para la fusión celular, los inmunocitos y las células de mieloma se mezclan bien en una cantidad predeterminada del medio. Generalmente se añade una solución de PEG (peso molecular medio: por ejemplo, aproximadamente 1000 a 6000) precalentada a aproximadamente 37 °C a la mezcla a una concentración de 30 a 60 % (p/v) y se mezcla con la misma para formar los hibridomas de interés. Posteriormente, se repiten procedimientos para añadir secuencialmente un medio adecuado y eliminar el sobrenadante por centrifugación para eliminar los agentes de fusión celular o similares desfavorables para el crecimiento de los hibridomas.

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

Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, se pueden obtener hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (*p.ej.*, actividad antiproliferativa celular) sensibilizando linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectado por el virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o sus lisados *in vitro* y que fusionan los linfocitos sensibilizados con células de mieloma procedentes de seres humanos que pueden dividirse permanentemente, por ejemplo, U266 (n.º de acceso TIB 196).

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales así preparados pueden subcultivarse en un medio convencional y también pueden almacenarse durante un largo período en nitrógeno líquido.

Específicamente, los antígenos o células deseadas 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 parentales conocidas en la técnica de acuerdo con un método de fusión celular convencional. Las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) se pueden tamizar mediante un método de tamizaje convencional para preparar el anticuerpo de interés.

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

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

Como alternativa, se pueden usar anticuerpos recombinantes, que se producen usando una técnica de recombinación génica que implica: clonar los genes del anticuerpo a partir de hibridomas; incorporar los genes del anticuerpo en vectores adecuados; e introducir los vectores en los huéspedes (véase, *p. ej.*, Carl, AK 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 usando transcriptasa inversa. Después de la obtención de los ADN que codifican las regiones V del anticuerpo de interés, los ADN se ligan con ADN que codifican las regiones constantes del anticuerpo deseado (regiones C). Los productos de ligación resultantes se incorporan a continuación 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.

Tal como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo anti-CAPRIN-1 de la presente invención es cualquiera de los diversos anticuerpos monoclonales que incluyen anticuerpos monoclonales de animales no humanos y anticuerpos recombinantes.

Estos anticuerpos monoclonales de animales no humanos pueden prepararse mediante el cultivo de hibridomas

obtenidos mediante la fusión entre células esplénicas de animales no humanos (*p. ej.*, ratones, ratones productores de anticuerpos humanos, pollo o conejos) inmunizados con proteínas CAPRIN-1 y células de mieloma.

El anticuerpo recombinante incluye, como se ha descrito anteriormente, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos multiespecíficos y similares.

El anticuerpo quimérico puede prepararse: ligando los ADN que codifican regiones variables de cadena ligera o pesada de un anticuerpo procedente de un animal no humano (*p. ej.*, ratón, rata, conejo o pollo) con los ADN que codifican regiones constantes de cadena ligera o pesada procedentes de un anticuerpo humano; incorporando los genes de fusión resultantes en vectores de expresión; e introduciendo los vectores en huéspedes de modo que se produzcan anticuerpos.

Específicamente, el anticuerpo quimérico es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de cadenas ligeras y pesadas de anticuerpos de ratón y una región constante de cadena pesada y ligera de anticuerpos humanos. El anticuerpo quimérico puede prepararse usando un método conocido en la técnica que implica, por ejemplo: ligar los ADN que codifican regiones V de anticuerpo de ratón con los ADN que codifican regiones C de anticuerpo humano; incorporar los productos de ligación resultantes en vectores de expresión; e introducir los vectores en huéspedes de modo que se produzcan anticuerpos. En los ejemplos descritos más adelante, se prepararon anticuerpos quiméricos de humano-ratón y se confirmó que tenían un efecto antitumoral. Estos anticuerpos monoclonales comprenden una región variable de cadena pesada (VH) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12, en los que la región VH comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:5, CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:6 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7 y la región VL comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11.

El anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano reconvertido, es un anticuerpo modificado por ingeniería genética. El anticuerpo humanizado se construye injertando las CDR de anticuerpo humano con las CDR correspondientes al anticuerpo procedente de un animal inmunizado. Específicamente, los ADN en los que las secuencias codificantes de CDR en los ADN que codifican una región variable de cadena ligera o pesada procedente de anticuerpo humano se sustituyen por las secuencias codificantes de CDR correspondientes de un anticuerpo procedente de animales no humanos (*p. ej.*, ratón, rata, conejo o pollo) se preparan y se ligan con los ADN que codifican regiones constantes de cadenas ligeras o pesadas procedentes de anticuerpos humanos. Los genes de fusión resultantes se pueden incorporar en vectores de expresión, que luego se introducen en huéspedes para la producción de anticuerpos para preparar el anticuerpo humanizado de interés.

Específicamente, por ejemplo, las secuencias de ADN diseñadas para unir las CDR de anticuerpos de ratón y pollo y las regiones marco de anticuerpos humanos (FR) se sintetizan por RCP usando varios oligonucleótidos preparados que tienen porciones terminales solapadas entre sí. Los ADN obtenidos se ligan con los ADN que codifican regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de ligación resultantes se incorporan en vectores de expresión, que luego 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 mediante CDR se seleccionan de manera que las CDR forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de anticuerpos pueden estar sustituidos de modo que las CDR del anticuerpo humano reconvertido resultante forman un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Además, estas regiones marco pueden reemplazarse por regiones marco procedentes de diversos anticuerpos humanos (véase la publicación internacional n.º WO99 /51743).

Las regiones marco de anticuerpo humano conectadas mediante CDR se seleccionan de manera que las CDR forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si es necesario, los aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de anticuerpos pueden estar sustituidos de modo que las CDR del anticuerpo humano reconvertido resultante forman un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856).

El anticuerpo monocatenario se refiere a un anticuerpo o el fragmento del mismo que comprende regiones variables de cadenas pesadas y ligeras conectadas linealmente entre sí a través de 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 se obtienen ambas de un anticuerpo humano o se obtienen de un anticuerpo humano que tiene las CDR solas sustituidas por las CDR de un anticuerpo procedente de un animal no humano (*p. ej.*, ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consiste en 12 a 19 aminoácidos. Ejemplos del mismo incluyen (G₄S)₃ que consiste en 15 aminoácidos (GB Kim y col., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

El anticuerpo multiespecífico se refiere a un anticuerpo que puede unirse específicamente a una pluralidad de epítopos diferentes. Por ejemplo, el anticuerpo biespecífico (diacuerpo) puede unirse específicamente a dos epítopos diferentes. Un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico puede prepararse ligando, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable A de cadena pesada, un ADN que codifica una región variable B de cadena ligera, un ADN que codifica una región variable B de cadena pesada y un ADN que codifica una la región variable A de cadena ligera en este orden (a condición de que el ADN que codifica una región variable B de cadena ligera y el ADN que codifica una región variable B de cadena pesada se ligan a través de un ADN que codifica un enlazador como se ha descrito anteriormente). En este contexto, las regiones variables de las cadenas pesada y ligera se obtienen todas de un anticuerpo humano o se obtienen de un anticuerpo humano que tiene las CDR solas sustituidas por las CDR de un anticuerpo procedente de un animal no humano (*p. ej.*, ratón, rata, conejo o pollo).

Los aminoácidos en las regiones variables (*p. ej.*, FR) o las regiones constantes del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado así preparado pueden sustituirse por otros aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos es la sustitución de, por ejemplo, menos de 15, menos de 10, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos aminoácidos, preferentemente 1 a 5 aminoácidos, más preferentemente 1 o 2 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debe ser funcionalmente equivalente a un anticuerpo no sustituido. Deseablemente, la sustitución es una sustitución conservativa de aminoácidos, que es la sustitución entre aminoácidos con propiedades similares, tales como carga, cadenas laterales, polaridad y aromaticidad. 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).

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

En este contexto, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que un anticuerpo de interés tiene una actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente, el anticuerpo de interés tiene la función de dañar el tumor y esencialmente no produce rechazo cuando se aplica a seres humanos, por ejemplo. Ejemplos de dicha actividad pueden incluir actividad antiproliferativa y actividad de unión.

Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido, que implica introducir una mutación en un polipéptido, es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los expertos en la materia pueden introducir adecuadamente una mutación en el anticuerpo de la presente invención usando mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. y *col.*, (1995) *Gene* 152: 271-275; Zoller, M J., 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 este modo un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

Un anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRIN-1 reconocida por cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 descrito anteriormente puede obtenerse 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 CAPRIN-1 reconocida por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 mediante un método convencional (*o.ej.*, mapeo de epítopos) 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 mediante un método convencional y seleccionar un anticuerpo que reconoce el mismo epítipo que el del anticuerpo anti-CAPRIN-1.

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

El anticuerpo de la presente invención puede conjugarse con un agente antitumoral. La conjugación del anticuerpo con el agente antitumoral se puede realizar a través de un espaciador que tiene un grupo (*p. ej.*, un grupo succinimidilo, un grupo formilo, un grupo 2-piridilitio, un grupo maleimidilo, un grupo alcóxicarbonilo o un grupo hidroxilo) reactivo con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o similares.

Ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, *etc.*: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfano, improsulfano, piposulfano, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina,

calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiestatina, 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, 5 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, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, 10 tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (*p. ej.*, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguaazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, 15 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, 20 aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasas, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los mismos.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente antitumoral para producir un mayor efecto terapéutico. Este enfoque es adaptable a un paciente con cáncer que 25 expresa CAPRIN-1 antes o después de la operación quirúrgica. Este enfoque puede aplicarse, particularmente después de la cirugía, al cáncer que expresa CAPRIN-1, que se ha tratado convencionalmente con un agente antitumoral solo, para producir una mayor prevención de la reaparición del cáncer o la prolongación del tiempo de supervivencia.

Ejemplos del agente antitumoral usado en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, *etc.*: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfano, improsulfano, piposulfano, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, 35 criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiestatina, 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, potfiomicina, puomicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, 45 floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguaazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, 50 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 topoisomerasas, difluorometilornitina (DMFO), ácido 55 retinoico, capecitabina y sales farmacéuticamente aceptables (conocidas en la técnica) y derivados (conocidos en la técnica) de los mismos. En particular, de estos agentes antitumorales, se usan preferentemente ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede unir a un radioisótopo conocido públicamente en 60 las bibliografías, *etc.*, tales como ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{175}Lu o ^{176}Lu . De forma deseable, se usa un radioisótopo eficaz para el tratamiento o el diagnóstico del tumor.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con CAPRIN-1, un anticuerpo que reconoce específicamente CAPRIN-1, o un anticuerpo que se une específicamente a CAPRIN-1 y 65 muestra actividad citotóxica o efecto antiproliferativo sobre el cáncer. El anticuerpo preferentemente debe tener una estructura que provoque poco o ningún rechazo en los animales receptores. Ejemplos de dichos anticuerpos

incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (*p. ej.*, anticuerpos quiméricos de humano-ratón), anticuerpos monocatenarios y anticuerpos biespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos (1) tienen regiones variables de cadenas pesadas y ligeras procedentes de un anticuerpo humano, (2) tienen regiones variables con CDR (CDR1, CDR2, y CDR3) de cadenas pesadas y ligeras derivadas de un anticuerpo animal no humano y regiones marco procedentes de un anticuerpo humano, o (3) estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de cadenas pesadas y ligeras procedentes de un anticuerpo de animal no humano y regiones constantes de cadenas pesadas y ligeras procedentes de un anticuerpo humano. El anticuerpo de la presente invención es preferentemente el anticuerpo (1) o (2).

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

Dicho ADN que codifica cada región variable o un ADN que codifica cada CDR se prepara usando una técnica de recombinación génica (Sambrook *y col.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. En este contexto, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos se pueden preparar inmunizando animales humanos productores de anticuerpos (*p. ej.*, ratones) con CAPRIN-1 humana y luego fusionando las células esplénicas extirpadas de los animales inmunizados con células de mieloma. Aparte de esto, se preparan los ADN que codifican regiones variables y constantes de cadenas ligeras o pesadas procedentes de anticuerpo humano, si es necesario, usando una técnica de recombinación génica o un sintetizador de ADN.

Los ADN recombinantes preparados se pueden incorporar a uno o más vectores adecuados, que luego se introducen en células huésped (*p. ej.*, células de mamífero, células de levadura y células de insecto) de modo que los ADN se (co)expresen para producir anticuerpos recombinantes (PJ Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY, P. Shepherd y C. Dean., Monoclonal Antibodies., 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; y JW Goding., Monoclonal Antibodies: principles and practice., 1993 ACADEMIC PRESS).

Ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparado mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluyen el siguiente anticuerpo (a) obtenido en los ejemplos descritos más adelante:

(a) un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 9, 10 y 11 (*p. ej.*, un anticuerpo compuesto por una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12).

En este contexto, las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena pesada de un anticuerpo de ratón. Las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 9, 10 y 11 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de una región variable de cadena ligera de un anticuerpo de ratón.

Ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo monocatenario o el anticuerpo multiespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos (i), (ii) e (iii):

(i) un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco procedentes de anticuerpo humano y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 9, 10 y 11 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco procedentes de anticuerpo humano;

(ii) un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco procedentes de anticuerpo humano, una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano, una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 9, 10 y 11 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco procedentes de anticuerpo humano, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano; y

(iii) un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos representadas por la SEQ ID NO: 8, una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano, una región variable de cadena

ligera que comprende la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano.

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

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

Las secuencias particulares anteriores de las regiones variables y las CDR de cadenas pesadas y ligeras en cada anticuerpo se proporcionan simplemente con fines ilustrativos. Es obvio que el anticuerpo de la presente invención no está limitado por las secuencias particulares. Se preparan hibridomas que puedan producir anticuerpos humanos CAPRIN-1 antihumanos o anticuerpos de animales no humanos (*p. ej.*, anticuerpos de ratón) diferentes de los descritos anteriormente, y los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas se recuperan y se evalúan como (o no) los anticuerpos de interés con actividad de unión inmunológica contra CAPRIN-1 humana y actividad citotóxica como índices. De este modo, se identifican los hibridomas de interés productores de anticuerpos monoclonales. A continuación, los ADN que codifican regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos de interés se producen a partir de los hibridomas y se secuencian, como se ha descrito anteriormente. Los ADN se usan para la preparación de los diferentes anticuerpos.

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

La presente invención proporciona además un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención, un ADN que codifica la cadena pesada o ligera del anticuerpo, o un ADN que codifica la región variable de la cadena pesada o ligera en el anticuerpo. Dicho ADN incluye, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7, y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOS: 9, 10, y 11, en el caso del anticuerpo (a).

Las 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 procedentes de otros anticuerpos. En este contexto, "otros anticuerpos" también incluyen anticuerpos procedentes de organismos no humanos y son preferentemente los procedentes de seres humanos desde el punto de vista de la reducción de los efectos secundarios. Específicamente, el ADN de la presente invención comprende preferentemente secuencias de nucleótidos que codifican secuencias de aminoácidos procedentes de anticuerpos humanos correspondientes de regiones que codifican cada región marco y cada región constante en las cadenas pesadas y ligeras.

Otros ejemplos del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluyen un ADN que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8, y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12. En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 13. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 14. Para estos ADN, se prefiere que una región que codifica cada región constante en las cadenas pesadas y ligeras comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente procedente de un anticuerpo humano.

Estos ADN de anticuerpos se pueden obtener, por ejemplo, mediante los métodos descritos anteriormente o el siguiente método: en primer lugar, se preparan ARN totales a partir de hibridomas relacionados con el anticuerpo de la presente invención usando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado, y los ADNc se sintetizan usando transcriptasa inversa y cebadores aleatorios o similares. Posteriormente, los ADNc que codifican anticuerpos se amplifican por RCP usando cebadores oligonucleotídicos para secuencias conservadas de cada región variable en genes de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos de ratón conocidos. Las secuencias que codifican las regiones constantes se pueden obtener mediante la amplificación por RCP de secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos del ADN puede incorporarse en un plásmido o un fago para la secuenciación, por ejemplo, y

determinarse de acuerdo con un método habitual.

El efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRIN-1 usado en la presente invención sobre las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 parece ser provocado por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células efectoras (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra las células que expresan CAPRIN-1.

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

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

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

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

La unión de anticuerpos anti-CAPRIN-1 a un número mayor de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de la célula cancerosa produce una actividad antitumoral más fuerte. De forma deseable, el número de moléculas de CAPRIN-1 a las que se unen los anticuerpos para el efecto antitumoral esperado es 10^4 o más, preferentemente 10^5 o más moléculas CAPRIN-1 por célula cancerosa medidas usando el anticuerpo anti CAPRIN-1 de la presente invención.

<Unión a células que expresan antígeno>

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

<Tinción inmunohistoquímica>

Puede probarse la reactividad del anticuerpo que reconoce CAPRIN-1 con CAPRIN-1 mediante un método inmunohistoquímico bien conocido por los expertos en la técnica usando una sección congelada fijada con paraformaldehído o acetona o una sección de un tejido impregnada en parafina fijada con paraformaldehído obtenido de un paciente durante la operación quirúrgica o de un animal que porta un heterotrasplante inoculado con una línea celular que expresa CAPRIN-1 de manera espontánea o después de la transfección.

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

<Composición farmacéutica>

Un objetivo de la composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer de la presente invención no está particularmente limitado siempre que el objetivo sea cáncer (células) que expresen un gen CAPRIN-1.

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

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

Ejemplos específicos de estos cánceres incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama de tipo complejo, tumor maligno mixto de la glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer de células pequeñas, cáncer de células grandes, glioma que es tumor de tejido neuroepitelial, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de células pequeñas a medianas, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transversal, cáncer de colon sigmoide, cáncer de recto, cáncer de ovario epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromales, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático invasivo, adenocarcinoma de páncreas, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia papilar-mucinoso intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, cistadenocarcinoma seroso, tumor sólido-pseudopapilar, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple tipo 1 (síndrome de Wermer), tumor de células de islotes no funcionales, somatostatinooma y VIPoma.

El sujeto de prueba como receptor es preferentemente mamíferos, por ejemplo, mamíferos que incluyen primates, animales de compañía, ganado y animales de deporte, y son particularmente preferentemente los seres humanos, perros y gatos.

En el caso de usar el anticuerpo de la presente invención como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica se puede formular mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. 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 se puede formular con el anticuerpo mezclado en una forma farmacéutica unitaria requerida para la práctica farmacéutica generalmente aceptada, en combinación adecuada con portadores o medios farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceite vegetal, un emulsionante, un agente de suspensión, un detergente, un estabilizador, un agente aromatizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, *etc.* La cantidad del principio activo en dicha preparación se determina de modo que se pueda conseguir una dosis adecuada dentro del intervalo prescrito.

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

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 o cloruro de sodio. Estas soluciones se pueden usar en combinación con un solubilizante adecuado, por ejemplo, un alcohol (específicamente, etanol) o un polialcohol (*p. ej.*, propilenglicol y polietilenglicol), o un detergente no iónico, por ejemplo, polisorbato 80 (TM) o HCO-60.

Ejemplos de soluciones oleosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones pueden usarse en combinación con un solubilizante tal como benzoato de bencilo o alcohol bencílico. Las soluciones se pueden mezclar adicionalmente con un tampón (*p. ej.*, una solución tampón de fosfato y una solución tampón de acetato de sodio), un agente suavizante (*p. ej.*, hidrócloruro de procaína), un estabilizador (*p. ej.*, alcohol bencílico y fenol) y un antioxidante. Las soluciones de inyección así preparadas se cargan generalmente en 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 farmacéuticas incluyen inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar y agentes de administración percutánea. Ejemplos de las inyecciones incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea, a través de los cuales la composición farmacéutica se puede administrar sistémica o localmente.

Además, el método de administración puede seleccionarse adecuadamente dependiendo de la edad, el peso, el sexo, los síntomas, *etc.* de un paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o un polinucleótido que codifica el anticuerpo se puede seleccionar 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 adecuadamente la dosis y el método.

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

La presente invención abarca además métodos para tratar y/o evitar 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 comprende el agente antitumoral para un sujeto de prueba. El anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención se puede administrar simultáneamente con o por separado del agente antitumoral al sujeto de prueba. En el caso de la administración por separado de estas composiciones farmacéuticas, cualquiera de las dos puede administrarse primero o más tarde. Sus intervalos de dosificación, dosis, vías de administración y el número de dosis pueden ser seleccionadas adecuadamente por un especialista. Las formas farmacéuticas de fármacos separados que se administrarán simultáneamente también incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formuladas cada una mezclando el anticuerpo o el fragmento del mismo de la presente invención y el agente antitumoral en un portador (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores sobre prescripción, formulación, vías de administración, dosis, cáncer, etc. en cuanto a las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas que contienen el anticuerpo de la presente invención también son aplicables a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas farmacéuticas descritas anteriormente que contienen el agente antitumoral.

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

<Polipéptido y ADN>

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

- (i) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOs: 8 y 12, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos representadas por las SEQ ID NOs: 13 y 14;
- (ii) un polipéptido de CDR de cadena pesada seleccionado de entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOs: 5, 6 y 7, y un ADN que codifica el polipéptido; y
- (iii) un polipéptido de CDR de cadena ligera seleccionado de entre el grupo que consiste en secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NOs: 9, 10 y 11, y un ADN que codifica el polipéptido.

Estos polipéptidos y los ADN pueden prepararse usando técnicas de recombinación génica como se ha descrito anteriormente.

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 está destinado a estar limitado por estos ejemplos específicos.

<Ejemplo 1: Análisis de la expresión génica de CAPRIN-1 en cada tejido>

La expresión génica de CAPRIN-1 en tejidos normales caninos y humanos y las diversas líneas celulares se examinaron mediante RCP-RT de acuerdo con el Ejemplo 1(4) descrito en el documento WO2010/016526. Como resultado, se observó una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que se observó expresión en cáncer de mama canino y tejidos de adenocarcinoma. Como resultado de confirmar también la expresión en tejidos humanos, la expresión se confirmó solo en los testículos entre tejidos normales, como con el gen canino CAPRIN-1. Por el contrario, la expresión se detectó en muchos tipos de líneas celulares de cáncer, incluidas 8 líneas celulares (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB -231V y MRK-nu-1) de cáncer de mama humano y 4 líneas celulares (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPc-3) de cáncer de páncreas, entre las células cancerosas. Estos resultados demostraron que CAPRIN-1 se expresa en diversas células cancerosas, aunque su expresión no se observa en tejidos normales distintos de los testículos.

<Ejemplo 2: Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón contra CAPRIN-1>

100 µg de proteínas CAPRIN-1 humanas que tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, que se prepararon en el Ejemplo 3 descrito en el 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 intraperitonealmente a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (Japan SLC, Inc.). A continuación, se realizaron 7 refuerzos cada 1 semana para completar la inmunización. Tres días después de la última descarga, se extirpó el bazo de cada ratón y se molió entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS(-) (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y la eliminación del sobrenadante por centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos se repitieron tres veces para obtener células esplénicas. Las células esplénicas obtenidas se mezclaron con células SP2/0 de mieloma de ratón (adquiridas en ATCC) en una proporción de 10:1. Se calentaron 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % a 37 °C y se mezclaron con 800 µl de PEG1500 (Boehringer Ingelheim GmbH), y se añadió la solución de PEG así preparada a la mezcla de células, que luego se dejó en reposo durante 5 minutos para la fusión celular. Después de eliminar el sobrenadante por centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPM 11640 que contenía FBS al 15 % suplementado con un equivalente de 2 % de una solución HAT (Life Technologies, Inc./Gibco) (medio HAT selectivo). Esta suspensión se inoculó en quince placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc) a una concentración de 100 µl/pocillo. Las células esplénicas y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo a 37 °C durante 7 días en condiciones de 5 % de CO₂ para obtener hibridomas.

Los hibridomas preparados se tamizaron con la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1 como índice. Se añadió una solución de µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadió una solución de albúmina de suero bovino (ASB) al 0,5 % (Sigma-Aldrich Corp.) a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución en cada pocillo se descartó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. A continuación, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a la misma a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadieron anticuerpos IgG (H+L) anti-ratón marcados con HRP (Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadió una solución de sustrato de TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producen anticuerpos que tienen una alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, se observaron hibridomas que formaban colonias individuales en los pocillos. Las células en estos pocillos se cultivaron adicionalmente, y los hibridomas clonados se tamizaron con la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1 como índice. Se añadió una solución de µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 descrito en el documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadió una solución de ASB al 0,5 % a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución en cada pocillo se descartó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. A continuación, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a la misma a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadieron anticuerpos IgG (H+L) anti-ratón marcados con HRP (Invitrogen Corp.) diluidos 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. A continuación, se añadió una solución de sustrato de TMB (Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. La absorbancia se midió a 450 nm y 595 nm usando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 112 hibridomas productores de anticuerpos monoclonales reactivos con las proteínas CAPRIN-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales se tamizaron para determinar anticuerpos reactivos con la superficie de las células de cáncer de mama que expresan CAPRIN-1. Específicamente, se centrifugaron 10⁶ células de la línea celular MDA-MB-231V de cáncer de mama humano en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos IgG de cabra anti-ratón marcados con FITC (Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejaron en reposo durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). Por otro lado, se realizó la misma operación que antes usando el suero de cada ratón Balb/c no tratado 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 tiene una intensidad de fluorescencia más fuerte 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 anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 2 se analizaron de acuerdo con un método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526 para sus secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos codificadas por el mismo. El anticuerpo monoclonal n.º 1 resultante estaba compuesto por una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y una región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12. La secuencia de nucleótidos resultante que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 se muestra en la SEQ ID NO: 13, y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 8. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de la cadena ligera de la misma se muestra en la SEQ ID NO: 14, y la secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 12.

Específicamente, se confirmó que el anticuerpo monoclonal n.º 1 consistía en la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 8 y la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos representada por la SEQ ID NO: 12, en el que la región variable de la cadena pesada tenía CDR1, CDR2 y CDR3 que consistían en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 5, 6, y 7, respectivamente, y la región variable de la cadena ligera tenía CDR1, CDR2 y CDR3 que consistían en secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 9, 10, y 11, respectivamente.

<Ejemplo 4: Preparación del anticuerpo monoclonal quimérico de humano-ratón>

Ambos extremos del fragmento de amplificación génica que comprende el nucleótido que codifica la región variable de cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón obtenido en el Ejemplo 3, que consiste en una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 13, se trató con enzimas de restricción, luego se purificaron y se insertaron de acuerdo con un método habitual en un vector pcDNA4/myc-His (Invitrogen Corp.) que ya tiene insertos génicos de una secuencia líder procedente de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG₁ humana que comprende la SEQ ID NO: 37. Además, el fragmento de amplificación génica que comprende el gen de la región variable de cadena ligera del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón que consiste en una secuencia de nucleótidos representada por la SEQ ID NO: 14 se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, luego se purificó y se insertó de acuerdo con un método habitual en un vector pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen Corp.) que ya tiene insertos génicos de una secuencia líder procedente de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena L de IgG₁ humana que comprende la SEQ ID NO: 38.

A continuación, el vector recombinante que tiene el inserto de la región variable de cadena pesada (SEQ ID NO: 13) del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón y el vector recombinante que tiene el inserto de la región variable de cadena ligera (SEQ ID NO: 14) del anticuerpo monoclonal n.º 1 de ratón se introdujo en células CHO-K1 (obtenidas de Riken Cell Bank). Específicamente, 2×10^5 de las células se cultivaron en un medio Ham's F12 (Invitrogen Corp.) que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos, y se lavaron con PBS(-). A continuación, se añadió a la misma un medio Ham's F12 fresco que contenía 1 ml de FBS al 10 % por pocillo. Se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores lisados en 30 µl de OptiMEM (Invitrogen Corp.) con 30 µl de reactivo de transfección Polyfect (Qiagen NV), y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 cotransfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio Ham's F12 que contenía FBS al 10 % suplementado con 200 µg/ml de Zeocin (Invitrogen Corp.) y 200 µg/ml de Geneticin (Roche Diagnostics KK) y luego se inoculó a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo para preparar una línea celular de manera estable que produce un anticuerpo monoclonal n.º 1 (n.º 1) quimérico de humano-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 usando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contienen el anticuerpo monoclonal n.º 1 quimérico de humano-ratón.

Además, se prepararon líneas celulares que producen de manera estable anticuerpos monoclonales comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón de la misma manera que anteriormente usando los siguientes anticuerpos monoclonales procedentes de ratón anti-CAPRIN-1 descritos en el documento WO2010/016526 como anticuerpos comparativos: un anticuerpo comparativo 1 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 15 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 16; un anticuerpo comparativo 2 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 17 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 18; un anticuerpo comparativo 3 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 19 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 20; un anticuerpo comparativo 4 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 22; un anticuerpo comparativo 5 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 23 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 24; un anticuerpo comparativo 6 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 25 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 26; un anticuerpo comparativo 7 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 27 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 28; un anticuerpo comparativo 8 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 29 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 30; un anticuerpo comparativo 9 que consiste en la región

variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 31 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 32; un anticuerpo comparativo 10 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 33 y la región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 34; y un anticuerpo comparativo 11 que consiste en la región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 35 y la región variable de cadena ligera de la 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 usando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contienen cualquiera de los anticuerpos comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón.

<Ejemplo 5: Expresión de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas usando anticuerpo anti-CAPRIN-1 n.º 1>

A continuación, las líneas celulares (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1) de cáncer de mama humano, las líneas celulares (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN) de cáncer de riñón, la línea celular (T24) de cáncer de vejiga urinaria, la línea celular (SKOV3) de cáncer de ovario, las líneas celulares (QG56 y A549) de cáncer de pulmón, las líneas celulares (Capan-2 y MIA-PaCa-2) de cáncer de páncreas, la línea celular (PC3) de cáncer de próstata, la línea celular (SW756) de cáncer de cuello uterino, la línea celular (HT1080) de fibrosarcoma, las líneas celulares (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373) de tumor cerebral, las líneas celulares (MNK28 y MNK45) de cáncer gástrico, las líneas celulares (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116) de cáncer de intestino grueso, la línea celular (AML5) de leucemia, y la línea celular de linfoma (Ramos) confirmadas que tienen la expresión del gen CAPRIN-1 se examinaron para su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie celular usando los sobrenadantes de cultivo que contenían n.º 1 obtenidos en el Ejemplo 4. Se centrifugaron 5×10^5 células de cada línea celular en cada tubo de microcentrifuga de 1,5 ml. Cada sobrenadante de cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo n.º 1 se añadió al tubo y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos IgG (H+L) de cabra anti-ratón marcados con FITC (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejaron en reposo a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia usando FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo usado fue células que reaccionaron solo con anticuerpos secundarios. Como resultado, las células suplementadas 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 CAPRIN-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. La tasa de potenciación de la intensidad de fluorescencia anterior se indicó mediante la tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (IFM) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

$$\text{Tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (Tasa de potenciación en la intensidad de fluorescencia) (\%)} = ((\text{IFM de células que reaccionaron con los anticuerpos anti-CAPRIN-1}) - (\text{Control IFM})) / (\text{Control IFM}) \times 100.$$

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

El anticuerpo monoclonal n.º 1 anti-CAPRIN-1 quimérico de humano-ratón obtenido en el Ejemplo 4 se estudió para su capacidad para dañar las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 por ensayo de actividad ADCC. El sobrenadante del cultivo de las células que producen el n.º 1 se purificó usando Hitrap Protein A Sepharose FF (GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Después del reemplazo con PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se usó para el ensayo de actividad. Se recogieron 10^6 células de cada una de las líneas celulares MCF7 de cáncer de mama humano, la línea celular HCT-116 de cáncer de intestino grueso humano, la línea celular MIA-PaCa-2 de cáncer de páncreas humano, la línea celular Caki-2 de cáncer de riñón humano y la línea celular QG56 de cáncer de pulmón humano que se confirmó que tenían expresión de CAPRIN-1 en un tubo de centrifuga de 50 ml, a las que luego se añadió 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 RPMI 1640 que contenía SFB al 10 % y se añadieron a una densidad de 2×10^5 células/pocillo a cada placa de 96 pocillos con fondo en V para preparar las células objetivo. El anticuerpo purificado n.º 1 y los anticuerpos comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón obtenidos en el Ejemplo 4 se añadieron cada uno a una concentración de 1 µg/pocillo. Una población celular que contiene células NK humanas separadas usando un método habitual a partir de linfocitos de sangre periférica humana se añadió a la placa a una densidad de 2×10^5 células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de 5 % de CO₂. Después del cultivo, se midió la cantidad de cromo 51 liberado de las células tumorales dañadas en el sobrenadante de cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-CAPRIN-1 contra las células cancerosas. El control negativo usado fue células suplementadas 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: se hicieron reaccionar células mononucleares de sangre periférica humana separadas de sangre periférica humana de acuerdo con un método habitual usando una solución de separación de gravedad específica Histopaque para la separación de células mononucleares de sangre periférica humana (Sigma-Aldrich Corp.) con diversos anticuerpos marcados con FITC (anticuerpo CD3 antihumano, anticuerpo CD20 antihumano, anticuerpo CD19 antihumano, anticuerpo CD11c antihumano y anticuerpo anti HLA-DR (Becton y Dickinson and Company)), y una población celular no teñida con los anticuerpos se separó usando un clasificador de células (FACS Vantage SE (Becton, y Dickinson and Company)) o un kit de separación de células NK humanas (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 usados tuvieron actividad citotóxica inferior al 5 % contra toda la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano, la línea celular QG56 de cáncer de pulmón humano, la línea celular HCT-116 de cáncer de intestino grueso humano, la línea celular MIAPaCa-2 de cáncer de páncreas humano y la línea celular Caki-2 de cáncer de riñón humano. Por el contrario, el anticuerpo n.º 1 mostró actividad citotóxica del 21 %, 11 %, 21 %, 27 % y 23 % contra la línea celular MCF7 de cáncer de mama humano, la línea celular QG56 de cáncer de pulmón humano, la línea celular HCT-116 de cáncer de intestino grueso humano, la línea celular MIAPaCa-2 de cáncer de páncreas humano y la línea celular Caki-2 de cáncer de riñón humano, respectivamente. Análogamente, los anticuerpos de control de isotipo usados y los anticuerpos comparativos 1 a 11 usados tuvieron actividad citotóxica inferior al 4 % contra todas las demás células cancerosas, las líneas celulares ZR75-1, T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1 de cáncer de mama, las líneas celulares T98G y U373 de glioma, una línea celular A549 de cáncer de pulmón, las líneas celulares Caki-1 y ACHN de cáncer de riñón, una línea celular SW756 de cáncer de cuello uterino, una línea celular T24 de cáncer de vejiga urinaria, las líneas celulares MKN28 y MKN45 de cáncer gástrico, una línea celular SW480 de cáncer de intestino grueso, una línea celular AML5 de leucemia y una línea celular Ramos de linfoma. Por el contrario, se confirmó que el anticuerpo n.º 1 tenía una actividad citotóxica del 10 % o mayor contra estas líneas celulares. Estos resultados mostraron que el anticuerpo monoclonal n.º 1 obtenido contra CAPRIN-1 daña las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 mediante su actividad ADCC, y demostraron que el anticuerpo n.º 1 muestra una actividad citotóxica más fuerte contra células cancerosas humanas que la de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

Estos resultados sobre la actividad citotóxica se obtuvieron mezclando el anticuerpo contra las CAPRIN-1 usadas en la presente invención, células linfocíticas (población que contiene células NK) y 2×10^3 células de cada línea de células cancerosas con cromo 51 incorporado, como se ha descrito anteriormente, seguido de cultivo de las células durante 4 horas, después del cultivo, midiendo la cantidad de cromo 51 liberado en el medio, y calculando la actividad citotóxica contra cada línea de células cancerosas de acuerdo con la siguiente expresión.

Expresión: Actividad citotóxica (%) = cantidad de cromo 51 liberado de las células objetivo suplementadas con el anticuerpo contra CAPRIN-1 y células linfocíticas (población que contiene células NK)/cantidad de cromo 51 liberado de las células objetivo suplementadas con ácido clorhídrico $1 \text{ N} \times 100$.

<Ejemplo 7: Efecto antitumoral del anticuerpo monoclonal anti-CAPRIN-1 sobre el ratón *in vivo*>

A continuación, el anticuerpo monoclonal n.º 1 quimérico de humano-ratón obtenido en el Ejemplo 4 se evaluó para determinar su efecto antitumoral sobre ratones portadores de cáncer *in vivo*. El anticuerpo usado se purificó en columna a partir del sobrenadante de cultivo de cada línea celular produciendo el anticuerpo n.º 1. De forma similar, los anticuerpos monoclonales comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón de los anticuerpos anti-CAPRIN-1 preparados en el Ejemplo 4 también se evaluaron para determinar sus efectos antitumorales sobre ratones portadores de cáncer *in vivo*.

El anticuerpo n.º 1 se estudió por su efecto antitumoral usando ratones portadores de cáncer en los que se trasplantó una línea celular de cáncer procedente de seres humanos que expresan CAPRIN-1. Se transplantaron 2×10^6 células Capan-2 de la línea celular de cáncer pancreático humano (adquiridas en ATCC) por ratón por vía subcutánea en los lomos de 65 ratones desnudos Balb/c (Japan SLC, Inc.) y se desarrollaron hasta que el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 5 mm de diámetro. El anticuerpo n.º 1 y los anticuerpos comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón se administraron cada uno por vía intraperitoneal a una dosis de 200 µg (200 µl)/ratón a 5 (por anticuerpo) de estos ratones portadores de cáncer. A continuación, cada anticuerpo se administró por vía intraperitoneal a los ratones portadores de cáncer a la misma dosis que antes, un total de tres veces durante 2 días. El tamaño del tumor se midió todos los días, y se observó el efecto antitumoral. Por otro lado, se administró PBS(-) en lugar de los anticuerpos a los 5 ratones restantes portadores de cáncer, que a su vez se usaron como grupo de control. El tamaño del tumor se calculó en términos de volumen de acuerdo con la expresión $0,5 \times (\text{eje mayor} \times \text{eje menor})$.

Como resultado de observar el efecto antitumoral en el grupo de prueba que recibió el anticuerpo n.º 1 contra CAPRIN-1, la proliferación tumoral se redujo al 65 % el día 29 después de la administración del anticuerpo (con el tamaño del tumor en el grupo control a la misma fecha definida como 100 %). Por el contrario, en los ratones que recibieron los anticuerpos comparativos 1 a 11 quiméricos de humano-ratón, la proliferación tumoral se redujo a aproximadamente 85 %. Estos resultados demostraron que el anticuerpo n.º 1 obtenido contra CAPRIN-1 ejerce un efecto antitumoral *in vivo* sobre las células cancerosas que expresan CAPRIN-1. Estos resultados también demostraron que el anticuerpo n.º 1 ejerce un efecto antitumoral *in vivo* más fuerte que el de los anticuerpos comparativos 1 a 11.

<Ejemplo 8: El número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas reconocidas por el anticuerpo anti-CAPRIN-1 n.º 1>

Las líneas celulares (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1) de cáncer de mama humano, las líneas celulares (Caki-1, Caki-2, A498 y ACHN) de cáncer de riñón, una línea celular (T24) de cáncer de vejiga urinaria, una línea celular (SKOV3) de cáncer de ovario, las líneas celulares (QG56 y A549) de

cáncer de pulmón, las líneas celulares Capan-2 y MIAPaCa-2) de cáncer de páncreas, una línea celular (PC3) de cáncer de próstata, una línea celular (SW756) de cáncer de cuello uterino, una línea celular (HT1080) de fibrosarcoma, las líneas celulares (T98G, U87MG, U251, SNB19 y U373) de tumor cerebral, las líneas celulares (MNK28 y MNK45) de cáncer gástrico, las líneas celulares (HT29, Lovo, CaCo2, SW480 y HCT116) de cáncer de intestino grueso, una línea celular (AML5) de leucemia y una línea celular (Ramos) de linfoma se examinaron usando un kit de ensayo QIFIKIT para el número de moléculas (Dako Japan Inc.) para el número de moléculas CAPRIN-1 en su superficie celular reconocidas por el anticuerpo n.º 1 anti-CAPRIN-1. De forma similar, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de estas diversas células cancerosas también se examinó usando los anticuerpos comparativos 1 a 11, que son anticuerpos monoclonales anti-CAPRIN-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 (en términos de 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, se añadieron anticuerpos IgG anti-ratón marcados fluorescentemente adjuntos al kit como anticuerpos secundarios, junto con perlas de calibración adjuntas al kit a cada línea celular y se dejaron en reposo 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 FACS Calibur (Becton, Dickinson and Company) para obtener un valor medio de intensidad de fluorescencia (media). Además, los anticuerpos comparativos se miden de forma similar a la anterior para obtener una media. El control negativo usado fue células reaccionadas con anticuerpos de control de isotipo y también se obtuvo una media. Cada valor medio de intensidad de fluorescencia (media) se usó para calcular el número de moléculas de acuerdo con el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas de CAPRIN-1 en la superficie de diversas células cancerosas reconocidas por el anticuerpo n.º 1 fue de 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 monoclonales 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 la prevención del cáncer.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

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

<130> CMD/FP6964613

140) Documento EP12820091.2

<141> 03-08-2012

<150> Documento PCT/JP2012/069853

<151> 03/08/2012

<150> Documento JP 2011-171377

<151> 04/08/2011

<160>38

<170> PatentIn version 3.1

<210>1

<211>5562

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (190)..(2319)

<223>

<400>1

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg 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 Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
15 20 25 30	
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
35 40 45	
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
50 55 60	
aag aaa ctt ccg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	

ES 2 672 695 T3

gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr 115 120 125	567
ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu 130 135 140	615
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys 145 150 155	663
ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly 160 165 170	711
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr 175 180 185 190	759
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln 195 200 205	807
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu 210 215 220	855
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu 225 230 235	903
cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn 240 245 250	951
ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp 255 260 265 270	999
cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln 275 280 285	1047
agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu 290 295 300	1095
aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val 305 310 315	1143
gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala 320 325 330	1191
tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala 335 340 345 350	1239
gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met 355 360 365	1287

ES 2 672 695 T3

cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn 370 375 380	1335
cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr 385 390 395	1383
caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu 400 405 410	1431
tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr 415 420 425 430	1479
cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln 435 440 445	1527
ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu 450 455 460	1575
cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr 465 470 475	1623
aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln 480 485 490	1671
gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala 495 500 505 510	1719
gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val 515 520 525	1767
cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln 530 535 540	1815
gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln 545 550 555	1863
aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His 560 565 570	1911
ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro 575 580 585 590	1959
cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn 595 600 605	2007
agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met 610 615 620	2055
aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt	2103

Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly			
625	630	635	
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151		
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser			
640	645	650	
cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat	2199		
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr			
655	660	665	670
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247		
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala			
675	680	685	
cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa	2295		
Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln			
690	695	700	
atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca	2349		
Met Asn Thr Gln Gln Val Asn			
705			
aaaacacact ggccagtgtt ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttgttct	2409		
ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat	2469		
tgtcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactatct ttactctgca tgttctgtcc	2529		
taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctccagattcc tcacccttgc ttaggagtaa	2589		
aacaatatac ttacaggggt gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag	2649		
gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctcga gttattcaat	2709		
gataactgac aaactaaatt atttccctag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtgggt	2769		
tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acgttcagat	2829		
gcataccaaa ttatgcatgg gtcctaatac cacatataag gctggctacc agctttgaca	2889		
cagcactggt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac	2949		
agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaattag gctttgattg gcactttttg	3009		
aaaaatatgc aacaaatatg ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa	3069		
tatttagata cctttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat	3129		
tggtactatc tatcattcct tatgacatgt acattgtctg tcactaatcc ttggattttg	3189		
ctgtattgtc acctaaattg gtacaggtac tgatgaaaat ctctagtgga taatcataac	3249		
actctcggtc acatgttttt ccttcagctt gaaagctttt ttttaaaagg aaaagatacc	3309		
aaatgcctgc tgctaccacc cttttcaatt gctatctttt gaaaggcacc agtatgtggt	3369		
ttagattgat ttccctgttt cagggaatc acggacagta gtttcagttc tgatggtata	3429		
agcaaaacaa ataaaacgtt tataaaagtt gtatcttgaa acactggtgt tcaacagcta	3489		
gcagcttatg tgattcacc catgccacgt tagtgtcaca aattttatgg tttatctcca	3549		
gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt	3609		

ES 2 672 695 T3

ctcogtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc cttcccttag atgcataggg 3669
agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729
ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789
tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849
taatgggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattcctt 3909
ccagtaggtg ctcagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969
tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctgttgaac attccacatt 4029
caaaagtttt gtaggggtgg gggaaatggg ggatcttcaa tgtttattttt aaaataaaat 4089
aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtggtac atcatattgg aagggttaac 4149
ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cctttgcgtg ctttaaatga 4209
catctgcctg ggatgtacca caaccatag ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat 4269
atgtgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329
atgtgtctat 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 acagttttaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629
tattttttaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689
ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749
ccttttggtt ggtcaaatgc atattttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809
tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttggtat atgcataata 4869
taaatacatc catgtggata tgaaacttct tttttaaaac ttaaaaagggt agaattgtat 4929
tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989
aaagtttttt ttcaatcatt gtacctgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049
atcagtttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109
tttccactta aaggagacat agaattgtgt cttattctca gaaggttcat taactgaggt 5169
gatgagttta caactagttg agcagtcagc ttcttaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229
atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289
tcattttatg ttttaagctc tgaatctgca ttccacttg gttgttttta agcattctaa 5349
attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgcccttgat cttgtccttt 5409
ttatggagtt aacggggagg aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469
tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatgtt 5529
taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

ES 2 672 695 T3

5 <210>2
 <211>709
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400>2

ES 2 672 695 T3

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

ES 2 672 695 T3

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
 450 455 460
 Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr Thr Ala
 465 470 475 480
 Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln Ala Gly

				485						490					495
Thr	Ser	Lys	Pro	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Asn	Ala	Ala	Pro
			500					505					510		
Phe	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Pro	Val	Pro	Pro
		515					520					525			
Val	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gln	Ala	Ser
	530					535						540			
Tyr	Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	His	Gln	Val	Glu	Gln	Thr	Glu
545					550					555					560
Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His	Gly	Ser
				565					570					575	
Pro	Asp	Gln	Ser	His	Gln	Val	Thr	Gly	Asn	His	Gln	Gln	Pro	Pro	Gln
			580					585						590	
Gln	Asn	Thr	Gly	Phe	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Asn	Ser	Arg
		595					600					605			
Gly	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Met	Asn	Gly
	610					615					620				
Tyr	Arg	Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Arg
625					630					635					640
Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ser	Gln	Phe
				645					650					655	
Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Arg	Asp	Gly	Tyr	Gln	Gln
			660					665					670		
Asn	Phe	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Gln	Ser	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	Pro	Arg
		675					680					685			
Gly	Arg	Gly	Gly	Pro	Pro	Arg	Pro	Asn	Arg	Gly	Met	Pro	Gln	Met	Asn
	690					695					700				
Thr	Gln	Gln	Val	Asn											
705															

<210>3
<211>3553

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

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgcca 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 Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
15 20 25 30	
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
35 40 45	
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
50 55 60	
aag aaa ctt ccg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tot 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	
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 ccg 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	

ES 2 672 695 T3

210										215										220									
aaa	cct	gta	tgt	gga	acc	acc	tat	aaa	gtt	cta	aag	gaa	att	gtt	gag														
Lys	Pro	Val	Cys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Val	Glu														
		225					230					235																	903
cgt	gtt	ttt	cag	tca	aac	tac	ttt	gac	agc	acc	cac	aac	cac	cag	aat														
Arg	Val	Phe	Gln	Ser	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser	Thr	His	Asn	His	Gln	Asn														951
		240				245					250																		
ggg	ctg	tgt	gag	gaa	gaa	gag	gca	gcc	tca	gca	cct	gca	gtt	gaa	gac														
Gly	Leu	Cys	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Asp														999
		255				260				265					270														
cag	gta	cct	gaa	gct	gaa	cct	gag	cca	gca	gaa	gag	tac	act	gag	caa														
Gln	Val	Pro	Glu		Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Gln															1047
				275					280					285															
agt	gaa	gtt	gaa	tca	aca	gag	tat	gta	aat	aga	cag	ttc	atg	gca	gaa														
Ser	Glu	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Val	Asn	Arg	Gln	Phe	Met	Ala	Glu														1095
			290				295					300																	
aca	cag	ttc	acc	agt	ggt	gaa	aag	gag	cag	gta	gat	gag	tggt	aca	gtt														
Thr	Gln	Phe	Thr	Ser	Gly	Glu	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Glu	Trp	Thr	Val														1143
		305					310					315																	
gaa	acg	gtt	gag	gtg	gta	aat	tca	ctc	cag	cag	caa	cct	cag	gct	gca														
Glu	Thr	Val	Glu	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Ala	Ala														1191
		320				325					330																		
tcc	cct	tca	gta	cca	gag	ccc	cac	tct	ttg	act	cca	gtg	gct	cag	gca														
Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Glu	Pro	His	Ser	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Ala														1239
		335			340				345					350															
gat	ccc	ctt	gtg	aga	aga	cag	cga	gta	caa	gac	ctt	atg	gca	caa	atg														
Asp	Pro	Leu	Val	Arg	Arg	Gln	Arg	Val	Gln	Asp	Leu	Met	Ala	Gln	Met														1287
			355				360						365																
cag	ggt	ccc	tat	aat	ttc	ata	cag	gat	tca	atg	ctg	gat	ttt	gaa	aat														
Gln	Gly	Pro	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gln	Asp	Ser	Met	Leu	Asp	Phe	Glu	Asn														1335
			370				375					380																	
cag	aca	ctt	gat	cct	gcc	att	gta	tct	gca	cag	cct	atg	aat	cca	aca														
Gln	Thr	Leu	Asp	Pro	Ala	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Pro	Met	Asn	Pro	Thr														1383
		385					390					395																	
caa	aac	atg	gac	atg	ccc	cag	ctg	gtt	tgc	cct	cca	gtt	cat	tct	gaa														
Gln	Asn	Met	Asp	Met	Pro	Gln	Leu	Val	Cys	Pro	Pro	Val	His	Ser	Glu														1431
		400				405					410																		
tct	aga	ctt	gct	cag	cct	aat	caa	gtt	cct	gta	caa	cca	gaa	gcg	aca														
Ser	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro	Asn	Gln	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr														1479
		415				420				425				430															
cag	gtt	cct	ttg	gta	tca	tcc	aca	agt	gag	ggg	tac	aca	gca	tct	caa														
Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ser	Gln														1527
			435						440				445																
ccc	ttg	tac	cag	cct	tct	cat	gct	aca	gag	caa	cga	cca	cag	aag	gaa														
Pro	Leu	Tyr	Gln	Pro	Ser	His	Ala	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu														1575
			450				455					460																	
cca	att	gat	cag	att	cag	gca	aca	atc	tct	tta	aat	aca	gac	cag	act														
Pro	Ile	Asp	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Thr														1623
		465				470						475																	

ES 2 672 695 T3

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 gcc act tac cat	1911
Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His	
560 565 570	
ggg tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct	1959
Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro	
575 580 585 590	
cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat	2007
Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn	
595 600 605	
agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg	2055
Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met	
610 615 620	
aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt	2103
Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly	
625 630 635	
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser	
640 645 650	
cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat	2199
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr	
655 660 665 670	
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc	2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala	
675 680 685	
cca cga ggt aat att ttg tgg tgg tga tcc tagctcc taagtggagc	2294
Pro Arg Gly Asn Ile Leu Trp Trp	
690	
ttctgttctg gccttggaag agctgttaat agtctgcattg ttaggaatac atttatcctt	2354
tccagacttg ttgctaggga ttaaatgaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttggacc	2414
caaatttttaa tttttgaatg atttaatttt cccgtgttact atataaactg tcttgaaaac	2474
tagaacatat tctcttctca gaaaaagtgt ttttccaact gaaaattatt tttcagggtcc	2534

ES 2 672 695 T3

taaaacctgc	taaatgtttt	taggaagtac	ttactgaaac	atTTTTgtaa	gacatttttg	2594
gaatgagatt	gaacatttat	ataaatttat	tattcctctt	tcattttttt	gaaacatgcc	2654
tattatattt	tagggccaga	caccctttaa	tggccggata	agccatagtt	aacattttaga	2714
gaaccattta	gaagtgatag	aactaatgga	atTTgcaatg	ccttttggac	ctctattagt	2774
gatataaata	tcaagttatt	tctgactttt	aaacaaaact	cccaaattcc	taactttattg	2834
agctatactt	aaaaaaaaatt	acaggttttag	agagttttttt	gtttttcttt	tactgttgga	2894
aaactacttc	ccattttggc	aggaagttaa	cctattttaac	aattagagct	agcatttcat	2954
gtagtctgaa	attctaaatg	gttctctgat	ttgagggagg	ttaaacaatca	aacaggtttc	3014
ctctattggc	cataacatgt	ataaaatgtg	tgttaaggag	gaattacaac	gtactttgat	3074
ttgaatacta	gtagaaactg	gccaggaaaa	aggtacattt	ttctaaaaat	taatggatca	3134
cttggaatt	actgacttga	ctagaagtat	caaaggatgt	ttgcatgtga	atgtgggtta	3194
tgttctttcc	caccttgtag	catattcgat	gaaagttgag	ttaactgata	gctaaaaatc	3254
tgttttaaca	gcatgtaaaa	agttatttta	tctgttaaaa	gtcattatac	agttttgaat	3314
gttatgtagt	ttctttttta	cagtttaggt	aataaggtct	gttttcattc	tggtgctttt	3374
attaattttg	atagtatgat	gttacttact	actgaaatgt	aagctagagt	gtacactaga	3434
atgtaagctc	catgagagca	ggtaccttgt	ctgtcttctc	tgctgtatct	attcccaacg	3494
cttgatgatg	gtgcctggca	catagtaggc	actcaataaa	tatttggtga	atgaatgaa	3553

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

 <400>4

5

10

ES 2 672 695 T3

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

ES 2 672 695 T3

Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys Glu Leu
 100 105 110
 Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr Ile Lys
 115 120 125
 Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu Gln Lys
 130 135 140
 Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys Leu Gly
 145 150 155 160
 Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly Val Pro
 165 170 175
 Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr Lys Leu
 180 185 190
 Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln Tyr Glu
 195 200 205
 His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu Lys Pro
 210 215 220
 Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu Arg Val
 225 230 235 240
 Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn Gly Leu
 245 250 255
 Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp Gln Val
 260 265 270
 Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln Ser Glu
 275 280 285
 Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu Thr Gln
 290 295 300
 Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val Glu Thr
 305 310 315 320
 Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala Ser Pro
 325 330 335
 Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala Asp Pro
 340 345 350

ES 2 672 695 T3

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
 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

ES 2 672 695 T3

610

615

620

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

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

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

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

Gly Asn Ile Leu Trp Trp
690

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

<400>5

Asn Ser Trp Phe Asn
1 5

<210>6
<211>19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400>6

Glu Ile Arg Leu Thr Ser Asp Asn Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

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

<400>7

Pro Glu Thr Ala Arg Ala Thr Phe Ala Tyr Trp
1 5 10

<210>8
<211>114
<212> PRT

ES 2 672 695 T3

<213> Mus musculus

<400>8

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ser

5

<210>9

<211>15

<212> PRT

10 <213> Mus musculus

<400>9

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

15

<210>10

<211>7

<212> PRT

<213> Mus musculus

20

<400>10

Lys Val Phe Asn Arg Phe Ser
1 5

25

<210>11

<211>9

<212> PRT

<213> Mus musculus

30

<400>11

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Arg Thr
1 5

<210>12
<211>118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400>12

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

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

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

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

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

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

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

Lys Leu Asn Gln Thr Gly
115

<210>13
<211>342
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400>13

ggaggaggct tgggtcaacc tggaggatct atgagactct cctgtgttgc ctctggattc 60
actttcagta actcctgggt taactgggtc cgccagtctc cagagaaggg gcttgagtgg 120
gttgctgaaa ttagattgac atctgataat tatgcaatat attatgcgga gtctgtgaaa 180
gggagggtca ccattctcaag agatgattcc aaaagcagtg tctatctgca aatgaacaac 240
ttaagagctg aagacactgg catttattac tgtaccaggc ctgagacagc tcgggctacg 300
tttgcttact ggggccaagg gaccacggtc acggtctcct ca 342

ES 2 672 695 T3

<210>14
 <211>354
 <212> ADN
 <213> Mus musculus

5

<400>14

```
cctgcttcca ccagtgatgt ttgatgacc caaactccac tctccctgcc tgtcagtctt      60
ggagatcaag cctccatctc ttgcagatct agtcagagca ttgtacatag taatggaaac      120
acctattttag aatggtacct gcagaaacca ggccagtctc caaaggtctt gatctacaaa      180
gtttttaacc gatttttctgg ggtcccagac aggttcagtg gcagtggatc agggacagat      240
ttcacactca agatcagcag agtggaggct gaggatctgg gagtttatta ctgctttcaa      300
ggttcacatg ttcctcggac gttcgggtgga ggcaccaagc tgaatcagac gggc          354
```

10

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

15

<400>15

ES 2 672 695 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ser Val Tyr
145

```

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

 <400>16

ES 2 672 695 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 672 695 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

```

5 <210>18
 <211>132
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <400>18

ES 2 672 695 T3

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

<210>19
 <211>148
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400>19

ES 2 672 695 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>20

<211>117

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400>20

ES 2 672 695 T3

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

<210>21
 <211>148
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400>21

5

ES 2 672 695 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

<400>22

ES 2 672 695 T3

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

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

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

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

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

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

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

<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

ES 2 672 695 T3

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

<400>24

5

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

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

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

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

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

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

Val Gln Val Pro Arg Arg Arg Ser Asn
100 105

10

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

<400>25

15

ES 2 672 695 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

<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

<210>27

<211>116

<212> PRT

<213> Mus musculus

ES 2 672 695 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

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 2 672 695 T3

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

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

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

ES 2 672 695 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

ES 2 672 695 T3

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

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

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

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

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

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

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

<210>32

<211>94

5 <212> PRT

<213> Mus musculus

<400>32

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

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

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

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

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

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

10

<210>33

<211>111

<212> PRT

15 <213> Mus musculus

ES 2 672 695 T3

<400>33

```

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

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

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

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

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

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

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

```

5 <210>34
 <211>102
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

10 <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

```

ES 2 672 695 T3

Pro Ser Trp Lys Ser Asn
100

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

15 <210>36
<211>99
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400>36

ES 2 672 695 T3

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

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

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

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

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys

65 70 75 80

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

Ser Asn Lys

<210>37

<211>330

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400>37

ES 2 672 695 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		

ES 2 672 695 T3

His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230					235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245						250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
			260					265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
	275						280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	
	290					295					300					
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	
305					310					315					320	
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys							
			325						330							

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

 <400>38

ES 2 672 695 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que tienen reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1, comprendiendo el anticuerpo o el fragmento del mismo una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NOS: 5, 6 y 7 y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NOS: 9, 10 y 11.
2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.
4. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, para su uso en un método para tratar y/o evitar el cáncer.
5. El anticuerpo o el fragmento del mismo para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
6. Una composición farmacéutica, que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como un principio activo.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en un método para tratar y/o evitar el cáncer.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
9. Una combinación farmacéutica, que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
10. La combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, para su uso en un método para tratar y/o evitar el cáncer.
11. La combinación farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
12. Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2.