

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 704 909**

51 Int. Cl.:

C07K 16/18 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.08.2014** **PCT/JP2014/071094**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.02.2015** **WO15020212**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2014** **E 14834828 (7)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.10.2018** **EP 3031826**

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

30 Prioridad:

09.08.2013 JP 2013166164

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

20.03.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

OKANO FUMIYOSHI;
SAITO TAKANORI;
MINAMIDA YOSHITAKA y
IDO TAKAYOSHI

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 704 909 T3

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

DESCRIPCIÓN

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

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo contra CAPRINA-1 o un fragmento del mismo y al novedoso uso farmacéutico del mismo como agente terapéutico y/o preventivo para un cáncer, etc.

10 Antecedentes de la técnica

Los cánceres son enfermedades que representan la causa principal de muerte. El tratamiento actual del mismo consiste principalmente en terapia quirúrgica, que puede combinarse con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del reciente desarrollo de novedosas técnicas quirúrgicas o el descubrimiento de novedosos agentes anticancerosos en los últimos años, el tratamiento actual del cáncer tiene un resultado insuficientemente mejorado, a excepción de para algunos tipos de cáncer. Con los recientes avances en biología molecular o inmunología del cáncer, en los últimos años se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente con cáncer, antígenos de cáncer que son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, genes que codifican tales antígenos de cáncer y similares, lo que genera expectativas acerca de una terapia para el cáncer específica dirigida a los antígenos del cáncer.

La proteína asociada a la activación citoplásmica y a la proliferación 1 (CAPRINA-1) se conoce como una proteína intracelular que se expresa tras la activación o división celular de las células normales que están en fase de reposo y forma gránulos de estrés citoplasmáticos con los ARN intracelulares para participar en la regulación del transporte y la traducción de los ARNm. Se ha descubierto que esta proteína se expresa específicamente en la superficie de las células cancerosas y se está estudiando como diana para fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer (bibliografía de patente 1 y 19).

Lista de citas

30 Bibliografía de patente

Bibliografía de patente 1: WO2010/016526
 Bibliografía de patente 2: WO2011/096517
 Bibliografía de patente 3: WO2011/096528
 Bibliografía de patente 4: WO2011/096519
 Bibliografía de patente 5: WO2011/096533
 Bibliografía de patente 6: WO2011/096534
 Bibliografía de patente 7: WO2011/096535
 Bibliografía de patente 8: WO2013/018886
 Bibliografía de patente 9: WO2013/018894
 Bibliografía de patente 10: WO2013/018892
 Bibliografía de patente 11: WO2013/018891
 Bibliografía de patente 12: WO2013/018889
 Bibliografía de patente 13: WO2013/018883
 Bibliografía de patente 14: WO2013/125636
 Bibliografía de patente 15: WO2013/125654
 Bibliografía de patente 16: WO2013/125630
 Bibliografía de patente 17: WO2013/125640
 Bibliografía de patente 18: WO2013/147169
 Bibliografía de patente 19: WO2013/147176

Sumario de la invención

Problema técnico

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

Solución al problema

La invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo, como se define en las reivindicaciones; y productos relacionados y productos para su uso, también como se define en las reivindicaciones.

La presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, que comprende un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las SEQ ID

NO: 1, 2 y 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, y tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1, o un fragmento de la misma como principio activo.

En una realización de la misma, el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, o cáncer de cabeza y cuello.

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

La presente memoria descriptiva abarca los contenidos descritos en la memoria descriptiva y/o los dibujos de la solicitud de patente japonesa número 2013-166164 en los que se basa la prioridad de la presente solicitud.

Efectos ventajosos de la invención

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

Descripción de las realizaciones

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

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

La frase "que se une específicamente a la proteína CAPRINA-1" significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRINA-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas.

El sujeto de acuerdo con la presente invención, cuyo cáncer se va a tratar y/o prevenir es un mamífero, tal como un ser humano, un animal de compañía, ganado o un animal de deporte, y un sujeto preferente es un ser humano.

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

<Preparación del antígeno para la preparación de anticuerpos>

Una proteína o fragmento de la misma usada como antígeno sensibilizante para obtener el anticuerpo contra la CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención no se limita por la especie animal que sirve de origen, incluyendo seres humanos, perros, gatos, ganado bovino, caballos, ratones, ratas y pollos. Sin embargo, se prefiere seleccionar el antígeno sensibilizante en vista de su compatibilidad con las células progenitoras para su uso en la fusión celular. En general, se prefiere una proteína procedente de mamífero. Particularmente, se prefiere una proteína procedente de ser humano. Por ejemplo, cuando la CAPRINA-1 es CAPRINA-1 humana, pueden usarse la proteína CAPRINA-1, un péptido parcial de la misma, células que expresan CAPRINA-1 humana o similares.

Pueden obtenerse secuencias de nucleótidos y secuencias de aminoácidos de una CAPRINA-1 humana y homólogas de las mismas, por ejemplo, accediendo a GenBank (NCBI, EE.UU.) y usando un algoritmo tal como BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993; y Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997).

En la presente invención, en referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 16 o 18) o la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 17 o 19) de la CAPRINA-1 humana, la CAPRINA-1 diana es un ácido nucleico o una proteína que consiste en una secuencia que tiene del 70 % al 100 %, preferentemente del 80 % al 100 %, más preferentemente de un 90 % a un 100 %, aún más preferentemente de un 95 % a un 100 %, por ejemplo, del 97 % al 100 %, del 98 %

al 100 %, del 99 % al 100 % o del 99,5 % al 100 % de identidad de secuencia con la secuencia de nucleótidos o la secuencia de aminoácidos del ORF o porción madura de la referencia (las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 19 en comparación una con otra difiere en los restos de aminoácidos en la siguiente posición 690). En este contexto, la expresión "% de identidad de secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos respecto del número total (incluido el número de huecos) de aminoácidos (o bases) cuando se alinean dos secuencias de tal forma que pueda lograrse el máximo grado de similitud o identidad con o sin huecos introducidos.

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

Un fragmento de polipéptido que comprende la proteína CAPRINA-1 humana mencionada anteriormente o un péptido parcial de la misma se pueden sintetizar de acuerdo con un procedimiento de síntesis química, por ejemplo, un procedimiento Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) o tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza 1 (Biochemical Experimentation Course 1 in English), the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). También, la proteína CAPRINA-1 humana o el fragmento polipeptídico se pueden sintetizar mediante un procedimiento de rutina utilizando varios sintetizadores de péptidos disponibles comercialmente. Como alternativa, puede prepararse un polinucleótido que codifica el polipéptido usando estrategias de ingeniería genética conocidas en la materia (Sambrook y col., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel y col., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.), y este polinucleótido se incorpora en vectores de expresión, que luego se transfieren a las células huésped para que el polipéptido se produzca en las células huésped. De esta manera, se puede obtener la proteína CAPRINA-1 humana o el fragmento de polipéptido de la misma de interés.

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

También, pueden prepararse sondas o cebadores adecuados basándose en información acerca de la secuencia de nucleótidos del gen de CAPRINA-1 y la secuencia de aminoácidos de la proteína CAPRINA-1 y usarse en la exploración de, por ejemplo, una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Es preferente que la biblioteca de ADNc se produzca a partir de células, órganos o tejidos que expresan la proteína CAPRINA-1. Ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos procedentes de los testículos así como de cánceres o tumores, tales como leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de riñón, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, sarcoma, mastocitoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides y cáncer de cabeza y cuello. Estos procedimientos, que incluyen la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidos por los expertos en la técnica y pueden realizarse de acuerdo con los procedimientos descritos en, por ejemplo, Sambrook y col., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), and Ausubel y col., (*ibid.*). El ADN que codifica la proteína CAPRINA-1 humana y el péptido parcial de la misma puede obtenerse a partir del ADN obtenido de este modo.

Las células huésped en las que se introducen los vectores de expresión pueden ser cualquier célula capaz de expresar el polipéptido. Ejemplos de células procariotas incluyen, aunque no de forma limitativa, *E. coli*. Ejemplos de células eucariotas incluyen, aunque no de forma limitativa: células de mamífero, tales como células de riñón de mono COS1 y células de ovario de hámster chino CHO; una línea celular de riñón embrionario humano HEK293; la línea celular de piel embrionaria de ratón NIH3T3; células de levadura, tales como células de levadura en gemación y de levadura en fisión; células de gusano de seda; y células de huevo de *Xenopus*.

En caso de usar células procariotas como células huésped, vectores de expresión que tienen un origen que permite la replicación en las células procariotas, un promotor, un sitio de unión al ribosoma, un sitio de clonación múltiple, un

terminador, un gen de resistencia a fármacos, un gen complementario auxótrofo, etc., se utilizan como vectores de expresión. etc. Ejemplos de vectores de expresión para *E. coli* pueden incluir la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET y sistemas de expresión pGEX. El ADN que codifica el polipéptido se incorpora en dichos vectores de expresión, y las células huésped procariontes se pueden transformar con estos vectores, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que el polipéptido codificado por el ADN se expresa en las células huésped procariontes. A este respecto, el polipéptido puede expresarse como una proteína de fusión con otra proteína.

En caso de usar células eucariotas como células huésped, se pueden usar vectores de expresión para células eucarióticas que tengan un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición de poli (A), etc., se utilizan como vectores de expresión. Ejemplos de tales vectores de expresión pueden incluir los vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que anteriormente, el ADN que codifica el polipéptido se incorpora en dichos vectores de expresión y las células huésped eucariotas se pueden transformar con estos vectores, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que el polipéptido codificado por el ADN se expresa en las células huésped eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, el polipéptido puede expresarse como varias proteínas de fusión marcadas con el marcador His (por ejemplo, (His)₆ a (His)₁₀), el marcador FLAG, el marcador myc, el marcador HA, GFP o similares.

La transferencia de los vectores de expresión a las células huésped puede emplear un procedimiento bien conocido, tal como electroporación, un procedimiento de fosfato de calcio, un procedimiento de liposomas, un procedimiento de DEAE dextrano, microinyección, infección viral, lipofección o unión con péptidos que penetran en las células.

Los tratamientos de separación conocidos en la técnica se pueden llevar a cabo en combinación para aislar y purificar el polipéptido de interés de las células huésped. Ejemplos del mismo incluyen, aunque no de forma limitativa, tratamiento con un desnaturante (por ejemplo, urea) o un tensioactivo, ultrasonidos, digestión enzimática, extracción por saturación de sal, fraccionamiento y precipitación de disolventes, diálisis, centrifugación, ultrafiltración, filtración en gel, SDS-PAGE, electroforesis de isoelectroenfoque, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de afinidad y cromatografía de fase inversa.

El antígeno preparado de este modo puede usarse como un antígeno sensibilizante como se menciona más adelante para producir el anticuerpo de acuerdo con la presente invención.

<Estructura del anticuerpo>

Los anticuerpos (inmunoglobulinas) normalmente son glucoproteínas heteromultiméricas que comprenden cada una al menos dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Las inmunoglobulinas, a excepción de las IgM, son glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, cada una compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Normalmente, Cada cadena ligera está unida a una cadena pesada mediante un puente disulfuro covalente, aunque el número de puentes disulfuro entre cadenas pesadas varía entre diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesada y ligera también tienen puentes disulfuro intracatenarios. Cada cadena pesada tiene un dominio variable (región VH) en un extremo, seguido de una serie de regiones constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (región VL) en un extremo y tiene una región constante sencilla en el otro extremo. La región constante de la cadena ligera se alinea con la primera región constante de la cadena pesada, mientras que el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Regiones particulares denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en los dominios variables del anticuerpo exhiben una variabilidad específica e imparten especificidad de unión al anticuerpo. Las porciones relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones marco (FR). Los dominios variables completos de cadena pesada y de cadena ligera tienen cada uno una estructura en la que cuatro regiones marco están conectadas a través de tres regiones determinantes de complementariedad, es decir, una estructura en la que FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4 están conectados en este orden desde el extremo N. Estas tres regiones determinantes de la complementariedad en la cadena pesada se llaman CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la misma. Asimismo, las regiones determinantes de la complementariedad en la cadena ligera se denominan CDRL1, CDRL2 e CDRL3. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR en cada cadena se mantienen próximas entre sí mediante las regiones marco y contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno en el anticuerpo, junto con las regiones determinantes de la complementariedad derivadas de la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión anticuerpo-antígeno, pero muestran varias funciones efectoras, por ejemplo, implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fcγ, semivida/velocidades de eliminación mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada de complemento.

<Preparación de anticuerpos>

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

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo de unirse al antígeno de CAPRINA-1 (una proteína CAPRINA-1 de longitud completa o un polipéptido parcial de la misma) in vivo. Mediante dicha unión a CAPRINA-1, el anticuerpo de la presente invención ejerce la función de dañar (por ejemplo, matar, suprimir, o causar la regresión de) las células tumorales. El anticuerpo de la presente invención puede dañar el tumor, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides o cáncer de cabeza y cuello a través de la unión a la proteína CAPRINA-1.

El anticuerpo de la presente invención no está particularmente limitado, preferentemente, siempre que el anticuerpo sea un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo de la presente invención incluye anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, diacuerpos y triacuerpos), anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv), y similares. También, el anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina de cualquier clase, por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgA, IgD o IgY, o de cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 o IgA2.

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

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

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

Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales se pueden preparar, por ejemplo, como se establece a continuación: en primer lugar, los animales se inmunizan con el antígeno sensibilizante de acuerdo con un procedimiento conocido en la técnica. Este procedimiento de inmunización implica generalmente, inyectar por vía intraperitoneal o subcutánea el antígeno sensibilizante a mamíferos. Específicamente, se mezcla el antígeno sensibilizante diluido con PBS o suspendido en PBS (solución salina tamponada con fosfato) solución salina fisiológica o similar en una cantidad apropiada, si se desea, con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, 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 vehículo apropiado para la inmunización con el antígeno sensibilizante.

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

Las células de mieloma de mamífero se usan como células progenitoras asociadas para fusionarse con los inmunocitos. En la materia se conocen varias líneas celulares, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. y col., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. y col., Nature (1978) 276, 269-270), FO (deSt. Groth, S.F. y col., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. y col., Nature (1979) 277, 131-133), 240E-1, 240E-W y 240E-W2 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 procedimiento conocido en la técnica, por ejemplo, el procedimiento 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, como promotor de fusión se usa polietilenglicol (PEG virus de hemaglutinante de Japón (VHJ)). Si se desea, se puede añadir adicionalmente para su uso un auxiliar tal como dimetilsulfóxido para mejorar la eficacia de la fusión.

La proporción entre los inmunocitos y las células de mieloma puede ajustarse de manera arbitraria. Por ejemplo, se puede usar un medio RPMI1640 o un medio MEM adecuado para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma, o un medio convencional para su uso en este tipo de cultivo celular como medio para usar en la fusión celular. Además, puede usarse un complemento de suero, tal como suero de ternero fetal (FCS) en combinación con el medio.

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

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

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

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

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

El antígeno puede prepararse de acuerdo con, por ejemplo, un procedimiento que usa células animales (publicación de patente JP (Kohyo) n.º 2007-530068 A (2007)) o un procedimiento que usa baculovirus (por ejemplo, publicación internacional n.º WO98/46777). Cuando el antígeno tiene baja inmunogenicidad, este antígeno se puede unir a una macromolécula inmunogénica, tal como la albúmina para la inmunización. El antígeno se puede administrar junto con un adyuvante para la inmunización.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo recombinante génico producido utilizando una técnica de recombinación de genes que implica: clonar un gen del anticuerpo desde un hibridoma; incorporar el gen del anticuerpo en vectores adecuados; y transferir los vectores a huéspedes (véase, por ejemplo, Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Específicamente, los ADNc de la región variable (región V) del anticuerpo se sintetizan a partir de los ARNm del hibridoma utilizando transcriptasa inversa. Después de obtener los ADN que codifican las regiones V del anticuerpo de interés, los ADN se ligan con ADN que codifican las regiones constantes de anticuerpos deseadas (regiones C). Los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión. Como alternativa, los ADN que codifican la región V del anticuerpo pueden incorporarse en vectores de expresión que contienen ADN de la región C del anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión para expresarse bajo el control de regiones de control de la expresión, por ejemplo, un potenciador y un promotor. A continuación, las células huésped se pueden transformar con los vectores de expresión resultantes y se les permite expresar el anticuerpo.

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención es, preferentemente, un anticuerpo monoclonal. El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, ratón, rata, de conejo y de pollo), anticuerpos monoclonales quiméricos y similares. El anticuerpo monoclonal puede prepararse mediante el cultivo de hibridomas obtenidos mediante la fusión entre esplenocitos de mamíferos no humanos (por ejemplo, ratones, ratones productores de anticuerpos humanos, pollos o conejos) inmunizados con la proteína CAPRINA-1 o un fragmento de la misma y células de mieloma. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo preparado a partir de una combinación de secuencias derivadas de distintos animales y es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena ligera y de cadena pesada de un anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico se puede preparar usando un procedimiento conocido en la técnica y se obtiene, por ejemplo: ligando los ADN que codifican las regiones V del anticuerpo con los ADN que codifican las regiones C del anticuerpo humano; incorporando los productos del ligado resultantes en vectores de expresión; y transfiriendo los vectores a huéspedes para la producción de anticuerpos.

En los ejemplos mencionados más adelante, una pluralidad de anticuerpos monoclonales humanizados y un anticuerpo monoclonal quimérico de conejo-ser humano se prepararon y se confirmó que tenían un fuerte efecto

antitumoral. Todos estos anticuerpos monoclonales tienen una región variable de cadena pesada (región VH) que comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1, CDR2 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3, y una región variable de la cadena ligera (región VL) que comprende CDR1 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, CDR2 representado por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:5 y CDR3 representada por la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:6. Estos anticuerpos monoclonales incluyen el anticuerpo humanizado N.º 0 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, el anticuerpo humanizado N.º 1 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11, el anticuerpo humanizado N.º 2 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, el anticuerpo humanizado N.º 3 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13, el anticuerpo humanizado N.º 4 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12, el anticuerpo humanizado N.º 5 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13, el anticuerpo humanizado N.º 6 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15, el anticuerpo humanizado N.º 7 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15, el anticuerpo humanizado N.º 8 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15, el anticuerpo humanizado N.º 9 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14, el anticuerpo humanizado N.º 10 que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15, y un anticuerpo quimérico de ser humano-conejo que consiste en una región VH que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 y una región VL que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21.

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

Específicamente, las secuencias de ADN diseñadas para unir las regiones determinantes de la complementariedad de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, de conejo o de pollo, y regiones marco de un anticuerpo humano se sintetizan por PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados que tienen porciones terminales que se superponen entre sí. Los ADN obtenidos se ligan con ADN que codifican regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión, que después se transfieren a 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 regiones marco de un anticuerpo humano conectado a través de las regiones determinantes de la complementariedad se seleccionan de manera que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno favorable. En caso necesario, los aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de anticuerpo se pueden sustituir de tal forma que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante formen un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Además, pueden reemplazarse estas regiones marco con regiones marco procedentes de diversos anticuerpos humanos (véase la publicación internacional n.º WO99/51743).

Para preparar el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, los aminoácidos en las regiones variables (por ejemplo, FR) o las regiones constantes pueden estar sustituidos, por ejemplo, por otros aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos es la sustitución de uno o más, por ejemplo, menos de 15, menos de 10, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos o 2 o menos aminoácidos, preferentemente de 1 a 9 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debe ser funcionalmente equivalente al anticuerpo no sustituido.

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

Un procedimiento de sustitución de aminoácidos que implica la introducción de una mutación en un polipéptido es bien conocido por los expertos en la técnica como un procedimiento para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un determinado polipéptido. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden introducir apropiadamente la sustitución de aminoácidos en el anticuerpo de la presente invención usando mutagénesis dirigida al sitio (Hashimoto-Gotoh, T. y col., (1995) Gene 152, 271-275; Zoller, MJ. y Smith, M. (1983) Methods Enzymol. 100, 468-500; Kramer, W. y col., (1984) Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, HJ., (1987) Methods Enzymol.

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

- 5 En el caso de introducción de sustitución de aminoácidos, deseablemente, la sustitución es una sustitución conservadora de aminoácidos. La sustitución conservadora de aminoácidos es la sustitución entre aminoácidos similares en propiedades tales como la carga, las cadenas laterales, polaridad y carácter aromático. Los aminoácidos se pueden clasificar en términos de propiedades similares en, por ejemplo: aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares no cargados (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína y tirosina); aminoácidos no polares (leucina, isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina); aminoácidos ramificados (leucina, valina e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano e histidina).

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

- 20 El anticuerpo que reconoce una proteína CAPRINA-1 o un polipéptido del fragmento de RINA-1 puede obtenerse mediante un procedimiento generalmente conocido por los expertos en la técnica. El anticuerpo puede ser obtenido por, por ejemplo, un procedimiento que implica determinar un epítipo de la proteína CAPRINA-1 reconocida por un anticuerpo anti-CAPRINA-1 por un procedimiento convencional (por ejemplo, mapeo de epítipos o un procedimiento de identificación de epítipos mencionado más adelante) y preparar un anticuerpo usando un polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo como un inmunógeno, o un procedimiento que implica
- 25 determinar un epítipo para un anticuerpo preparado por un procedimiento convencional y seleccionar un anticuerpo que reconozca el mismo epítipo que el de un anticuerpo anti-CAPRINA-1.

- El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con CAPRINA-1, un anticuerpo que reconoce específicamente la CAPRINA-1, o un anticuerpo que se une específicamente a la CAPRINA-1 y exhibe actividad citotóxica contra un cáncer o un efecto inhibidor del crecimiento tumoral. Es preferente que el anticuerpo sea un anticuerpo que tenga una estructura que cause poco o ningún rechazo en los animales receptores. Ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos de ser humano-ratón), anticuerpos monocatenarios y anticuerpos multiespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano, que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera que comprenden regiones determinantes de la complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) derivadas de un anticuerpo animal no humano y regiones marco (FR1, FR2, FR3 y FR4) derivadas de un anticuerpo humano, o que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo animal no humano y regiones constantes de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano. Los anticuerpos preferentes son los dos primeros anticuerpos.

- Dichos anticuerpos recombinantes pueden producirse del modo siguiente: un ADN que codifica el anticuerpo monoclonal (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal de ser humano, ratón, rata, conejo o pollo) contra la CAPRINA-1 humano se clona a partir de células productoras de anticuerpos, tales como los hibridomas, y se usa como molde en la RT-PCR o similar para preparar ADN que codifica las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de el anticuerpo. Las secuencias respectivas de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada, las respectivas secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 en cada región, o las secuencias respectivas de FR1, FR2, FR3 y FR4 en cada región se pueden determinar sobre la base de, por ejemplo, el sistema de numeración de la UE de Kabat (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 una de estas regiones variables o un ADN que codifica cada región determinante de la complementariedad se prepara adicionalmente mediante una técnica de recombinación de genes (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 mencionados anteriormente se pueden preparar inmunizando a animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) con CAPRINA-1 humana y, después, fusionando esplenocitos extirpados de los animales inmunizados con células de mieloma. Aparte de esto, se preparan ADN que codifican regiones variables y constantes de cadena ligera o cadena pesada derivadas de anticuerpos humanos, si es necesario, utilizando una técnica de recombinación de genes o un sintetizador de ADN.

- Para el anticuerpo humanizado, las secuencias de codificación de CDR en el ADN que codifica la región variable de cadena ligera o cadena pesada derivada de anticuerpo humano pueden sustituirse por las secuencias de codificación de CDR correspondientes de un animal no humano (por ejemplo, anticuerpo derivado de ratón, rata, conejo o pollo) para preparar así un ADN que codifica un anticuerpo humanizado. En el caso de, por ejemplo, un anticuerpo humanizado en el que las secuencias codificantes de CDR derivadas de un anticuerpo humano se sustituyen por las

correspondientes secuencias codificantes de CDR derivadas de un anticuerpo de ratón, cada región variable está constituida por FR1 humano, CDR1 de ratón, FR2 humano, CDR2 de ratón, FR3 humano, CDR4 de ratón y FR4 humano en este orden desde el extremo N.

5 Para el anticuerpo quimérico, el ADN que codifica la región variable de la cadena ligera o cadena pesada de un animal no humano (por ejemplo, el anticuerpo de ratón, rata, conejo o pollo puede ligarse con el ADN que codifica una región constante de cadena ligera o cadena pesada derivada de un anticuerpo humano para preparar un ADN codificante de anticuerpo quimérico.

10 En el caso de un anticuerpo monocatenario, este anticuerpo se refiere a un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera unidas linealmente 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, tanto de la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena ligera derivan de un anticuerpo humano o derivan de un anticuerpo humano que tiene regiones determinantes de la complementariedad solo sustituidas por regiones determinantes de la complementariedad de un animal no humano (por ejemplo, anticuerpo de ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consiste en de 12 a 19 aminoácidos. Ejemplos de los mismos incluyen $(G_4S)_3$ que consiste en 15 aminoácidos (G.-B. Kim y col., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

20 En el caso del anticuerpo biespecífico (por ejemplo, diacuerpo), este anticuerpo se refiere a un anticuerpo capaz de unirse específicamente a dos epítomos diferentes. Puede prepararse un ADN que codifica el anticuerpo biespecífico ligando, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable A de la cadena pesada, un ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera, un ADN que codifica la región variable B de la cadena pesada y un ADN que codifica la región variable A de la cadena ligera en este orden (siempre que el ADN que codifica una región variable B de la cadena ligera y el ADN que codifica una región variable A de la cadena pesada se ligan a través de un ADN que codifica un enlazador como se ha descrito anteriormente). En este contexto, todas las regiones variables de la cadena pesada y las regiones variables de la cadena ligera derivan de un anticuerpo humano o derivan de un anticuerpo humano que tiene regiones determinantes de la complementariedad solo sustituidas por regiones determinantes de la complementariedad de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo).

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

40 Ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparados por cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente incluyen los siguientes anticuerpos (a) a (l) que comprenden una región variable de cadena pesada que comprende las SEC ID NO: 1, 2 y 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, obtenidas en los ejemplos mencionados más adelante:

- 45 (a) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:15,
- (b) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:15,
- (c) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:15,
- 50 (d) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:13,
- (e) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12,
- (f) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:12,
- 55 (g) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:13,
- (h) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:10 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:14,
- 60 (i) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:8 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:11,
- (j) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:7 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:11,
- (k) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:9 y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO:15, y
- 65 (l) un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO:20 y una región variable de

cadena ligera de SEQ ID NO:21.

En este contexto, las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la región variable de cadena pesada del anticuerpo de conejo y las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 4, 5 y 6 corresponden a CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo de conejo.

El anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo monocatenario o el anticuerpo biespecífico de la presente invención es, por ejemplo, cualquiera de los siguientes anticuerpos (i) a (xiv):

- (i) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco conservadas procedentes de anticuerpo humano, o formas sustituidas de las mismas, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco derivadas de anticuerpo humano, o formas sustituidas de las mismas,
- (ii) un anticuerpo que comprende una región variable de la cadena pesada que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, 2 y 3 y las secuencias de aminoácidos de las regiones marco derivadas de anticuerpo humano, o formas sustituidas de las mismas, y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, y las secuencias de aminoácidos de regiones marco derivadas de anticuerpo humano, o formas sustituidas de las mismas, y una región constante de la cadena ligera que comprende las secuencias de aminoácidos derivadas de anticuerpo humano,
- (iii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (iv) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (v) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:15 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (vi) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (vii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (viii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (ix) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (x) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:14 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,
- (xi) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de

aminoácidos de anticuerpo humano,

(xii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos procedente de anticuerpo humano,

(xiii) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y

(xiv) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 y una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano, y una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 21 y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano.

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

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

Los anticuerpos antes mencionados pueden tener cada uno la sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos en una secuencia de región determinante de la complementariedad, una secuencia de la región marco y/o una secuencia de la región constante, siempre que el anticuerpo resultante tenga una especificidad tal que pueda reconocer específicamente a la CAPRINA-1. En este contexto, el término "varios" significa, preferentemente, de 1 a 9.

La constante de afinidad K_a (k_{on}/k_{off}) del anticuerpo de la presente invención para una proteína CAPRINA-1 o un fragmento de la misma es, preferentemente, 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} , al menos 10^{13} M^{-1} , o al menos 10^{14} M^{-1} .

Un mecanismo que subyace al efecto antitumoral del anticuerpo de la presente invención sobre las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células efectoras contra las células que expresan CAPRINA-1. La actividad antitumoral del anticuerpo de la presente invención a través de ADCC puede mejorarse sustituyendo uno o varios aminoácidos en la región constante de la cadena pesada del anticuerpo de la presente invención o eliminando la fucosa agregada a la N-acetilglucosamina en una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada. La actividad antitumoral del anticuerpo de la presente invención a través de ADCC puede potenciarse aún más combinando la sustitución de aminoácidos y la eliminación de fucosa de la región constante de la cadena pesada.

Un anticuerpo de este tipo que carece de fucosa añadida a N-acetilglucosamina en una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada de acuerdo con la presente invención puede usarse sola o puede ser una composición con un anticuerpo fucosilado. Se prefiere que la composición del anticuerpo esté compuesta principalmente por el anticuerpo que carece de fucosa.

El anticuerpo en el que uno o varios aminoácidos en la región constante de la cadena pesada están sustituidos se puede preparar con referencia a, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO2004/063351, la publicación internacional n.º WO2011/120135, la patente de EE.UU. n.º 8388955, la publicación internacional n.º WO2011/005481, la patente de Estados Unidos n.º 6737056 y la publicación internacional WO 2005/063351. El anticuerpo que carece de fucosa agregada a la N-acetilglucosamina en una cadena de azúcar ligada a N-glucósido en la región constante de la cadena pesada, o las células que producen el anticuerpo pueden prepararse con referencia a, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 6602684, la patente europea n.º 1914244 y la patente de Estados Unidos n.º 7579170. La composición del anticuerpo que carece de fucosa agregada a la N-acetilglucosamina en una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada, y el anticuerpo fucosilado, o las células que producen la composición, se pueden preparar con referencia a, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 8642292.

El anticuerpo de la presente invención se puede conjugar con un agente antitumoral. La conjugación del anticuerpo con el agente antitumoral se puede llevar a cabo a través de un espaciador que tiene un grupo (por ejemplo, un grupo

succinimidilo, un grupo formilo, un grupo 2-piridiltio, un grupo maleimidilo, un grupo alcoxicarbonilo o un grupo hidroxilo reactivo con un grupo amino, un grupo carboxilo, un grupo hidroxilo, un grupo tiol o similar.

Ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, piposulfán, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongistatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, 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, idarubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamina, olivomicina, peplomycin, potfiomicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitostanol, mepitostano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frofínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasas, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales y derivados farmacéuticamente aceptables de los mismos.

Cuando el anticuerpo es un anticuerpo conjugado con un agente antitumoral, un procedimiento para evaluar si ejercer actividad antitumoral puede implicar, por ejemplo, para el anticuerpo anti-CAPRINA-1 derivado de ratón, haciendo reaccionar un anticuerpo secundario unido al fármaco a un anticuerpo de ratón junto con el mismo para evaluar *ex vivo* el efecto antitumoral en células cancerosas humanas. Esta evaluación puede ser conducida usando, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG humano (Hum-ZAP (Advanced Targeting Systems, Inc.)), que es una segunda inmunotoxina unida con saporina.

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

Por ejemplo, se puede usar cualquiera de los agentes antitumorales descritos anteriormente como agente antitumoral para su uso en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención. Particularmente, se utiliza preferentemente ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina.

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

<Efecto antitumoral>

El efecto antitumoral del anticuerpo anti-CAPRINA-1 utilizado en la presente invención en células cancerosas que expresan CAPRINA-1 se considera que tiene lugar bajo el siguiente mecanismo o similar: la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) de las células efectoras contra las células que expresan CAPRINA-1 mencionada anteriormente y la fagocitosis celular dependiente de anticuerpo (ADCP) de las células que expresan CAPRINA-1. Sin embargo, el alcance de la presente invención no pretende estar limitado por este mecanismo.

Por tanto, la actividad del anticuerpo anti-CAPRINA-1 utilizado en la presente invención puede evaluarse, como se muestra específicamente a continuación en los ejemplos, midiendo *ex vivo* la actividad ADCC o la actividad ADCP contra las células cancerosas que expresan CAPRINA-1.

El anticuerpo anti-CAPRINA-1 usado en la presente invención se une a la proteína CAPRINA-1 en las células cancerosas y muestra un efecto antitumoral a través de la actividad o similar. Por tanto, el anticuerpo anti-CAPRINA-

1 de la presente invención es, presumiblemente, útil en el tratamiento o prevención de un cáncer. Específicamente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención del cáncer, que comprende el anticuerpo anti-CAPRINA-1 como principio activo. El anticuerpo anti-CAPRINA-1 que se va a utilizar para el propósito de administración a cuerpos humanos (terapia de anticuerpos) es, preferentemente, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

Un anticuerpo anti-CAPRINA-1 con mayor afinidad de unión a la proteína CAPRINA-1 en la superficie de las células cancerosas ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por tanto, el anticuerpo de la presente invención tiene una alta afinidad de unión para la proteína CAPRINA-1 y, por lo tanto, se puede esperar que tenga un efecto antitumoral más fuerte. En consecuencia, el anticuerpo de la presente invención es adaptable a una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o prevención de un cáncer. Dicha alta afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, 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} , al menos 10^{13} M^{-1} , o al menos 10^{14} M^{-1} , en términos de una constante de asociación (constante de afinidad) K_a (K_{on}/K_{off}), tal como se ha descrito anteriormente.

<Unión a células que expresan antígeno>

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

<Tinción inmunohistoquímica>

El anticuerpo que reconoce la CAPRINA-1 puede usarse en inmunohistoquímica por un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica. El anticuerpo que reconoce CAPRINA-1 puede probarse para determinar su reactividad con CAPRINA-1, por ejemplo, utilizando una sección congelada fijada con paraformaldehído o acetona o una sección fijada con paraformaldehído e incrustada en parafina de un tejido obtenido de un paciente durante el tratamiento quirúrgico o un tejido obtenido de un animal que porta un tejido de xenoinjerto inoculado con una línea celular que expresa CAPRINA-1 espontáneamente o después de la transfección.

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

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

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

Los términos "tumor" y "cáncer" utilizados en la presente memoria descriptiva significan neoplasias malignas y se usan indistintamente entre sí.

El cáncer objetivo de la presente invención puede ser cualquier cáncer que expresa la proteína CAPRINA-1 en la superficie de la membrana celular. El cáncer es, preferentemente, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, o cáncer de cabeza y cuello como se ha mencionado anteriormente.

Más específicamente, ejemplos de estos cánceres incluyen, aunque no de forma limitativa, 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 microcítico, cáncer macrocítico, glioma que es tumor de tejido neuroepitelial, glioblastoma, neuroblastoma, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de células pequeñas a medias, cáncer cecal, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transverso, cáncer de colon sigmoide, cáncer rectal, cáncer de ovarios epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromales, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia papilar-mucinoso intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, adenoma de las células del islote, tumor de Frants, cistadenocarcinoma seroso, tumor pseudopapilar sólido, gastrinoma, glucagonoma, insulinooma, neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (síndrome de Wermer), tumor de células de los islotes no funcionales, somatostatinooma, VIPoma, cáncer de cuello uterino, cáncer de cuerpo uterino, fibrosarcoma, sarcoma de huesos o articulaciones, sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, hepatoblastoma, sarcoma de

tejidos blandos, leucemia aguda, leucemia crónica, tumor de la médula espinal, tumor maligno de tejidos blandos, tumor del grupo de teratoma y cáncer de cabeza y cuello, incluido el cáncer de hipofaringe, cáncer de orofaringe, cáncer de lengua, cáncer de epifaringe, cáncer oral, cáncer de labios, cáncer sinusal y cáncer de garganta.

- 5 Los sujetos receptores (pacientes) son, preferentemente, mamíferos, por ejemplo, mamíferos, incluyendo primates, animales de compañía, ganado y animales de deporte, y, de manera particularmente preferente, seres humanos, perros y gatos.

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

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

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

- 30 Ejemplos de soluciones oleosas incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones se pueden usar en combinación con benzoato de bencilo o alcohol bencílico como solubilizante. Las soluciones se pueden mezclar adicionalmente con un tampón (por ejemplo, una solución de tampón fosfato y una solución de tampón acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencílico y fenol), y un antioxidante. Las soluciones para inyección preparadas de este modo se cargan normalmente en ampollas adecuadas.

- 35 La composición farmacéutica de la presente invención se administra por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Ejemplos específicos de sus formas de dosificación 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 las cuales la composición farmacéutica se puede administrar sistémica o localmente.

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

- 50 La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención o el fragmento de la misma puede administrarse a un sujeto para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, o cáncer de cabeza y cuello.

- 60 La presente invención abarca además medios para tratar y/o prevenir el cáncer, mediante la administración de la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral como se ha ejemplificado anteriormente o una composición farmacéutica que contiene dicho agente antitumoral a un sujeto. El anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo se puede administrar simultáneamente con el sujeto o por separado del agente antitumoral al sujeto. En el caso de la administración separada, cualquiera de sus composiciones farmacéuticas se puede administrar primero o más tarde. Sus intervalos de dosificación, dosis, vías de administración y número de dosis pueden seleccionarse de manera adecuada por un especialista. En el caso de administración simultánea, la forma de dosificación también incluye, por ejemplo, una composición farmacéutica formulada cada una mezclando el anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo y el agente antitumoral en un vehículo (o medio)

farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores sobre la prescripción, la formulación, las vías de administración, dosis, los cánceres, etc., referentes a las composiciones farmacéuticas y las formas de dosificación que contienen el anticuerpo de la presente invención también pueden aplicarse a cualquiera de las composiciones farmacéuticas y formas de dosificación que contienen el agente antitumoral.

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

<Polipéptido y ADN>

La presente invención proporciona además un ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención, un ADN que codifica la cadena pesada o la cadena ligera del anticuerpo, y un ADN que codifica la región variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. Tales ADN incluyen, en el caso del anticuerpo (a), por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de la cadena pesada, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y un ADN que codifica una región variable de cadena ligera, que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6.

Dado que las regiones determinantes de la complementariedad codificadas por los ADN que tienen estas secuencias son regiones que determinan la especificidad del anticuerpo, las secuencias que codifican las otras regiones (es decir, regiones constantes y regiones marco) del anticuerpo pueden ser secuencias derivadas de un anticuerpo diferente. En este contexto, el anticuerpo diferente también incluye un anticuerpo derivado de un organismo no humano, pero es, preferentemente, uno derivado de un ser humano desde el punto de vista de la reducción de la reacción adversa. Específicamente, para los ADN mencionados anteriormente, se prefiere que las regiones que codifican las regiones marco respectivas de la cadena pesada y la cadena ligera y cada región constante comprendan secuencias de nucleótidos que codifiquen las secuencias de aminoácidos correspondientes derivadas de un anticuerpo humano.

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 de la SEQ ID NO:8, y un ADN en el que una región que codifica una región variable de cadena ligera comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15. En este contexto, un ejemplo de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 es la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:23. También, un ejemplo de la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15 es la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:30. Para estos ADN, también se prefiere que las regiones que codifican las regiones constantes respectivas de la cadena pesada y la cadena ligera comprendan secuencias de nucleótidos que codifiquen las secuencias de aminoácidos correspondientes derivadas de un anticuerpo humano.

Estos ADN de anticuerpo se pueden obtener mediante, por ejemplo, el procedimiento mencionado anteriormente o el siguiente procedimiento: en primer lugar, el ARN total se prepara a partir del hibridoma relacionado con el anticuerpo de la presente invención utilizando un kit de extracción de ARN disponible comercialmente, y el ADNc se sintetiza con transcriptasa inversa utilizando cebadores aleatorios o similares. Posteriormente, el ADNc que codifica el anticuerpo se amplifica mediante PCR usando, como cebadores, oligonucleótidos que tienen secuencias respectivamente conservadas en las respectivas regiones variables de un gen de cadena pesada y un gen de cadena ligera de anticuerpo de ratón conocido. Las secuencias que codifican regiones constantes se pueden obtener amplificando secuencias conocidas por PCR. La secuencia de nucleótidos del ADN resultante se puede determinar mediante un procedimiento de rutina, por ejemplo, mediante integración en un plásmido o un fago para secuenciación.

La presente invención proporciona además polipéptidos y ADN descritos en los siguientes (i) a (xv) relacionados con los anticuerpos (i) a (xiv):

- (i) un polipéptido de la CDR de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos mostradas por las SEQ ID NO: 1, 2 y 3, y un ADN que codifica el polipéptido,
- (ii) un polipéptido la CDR de la cadena ligera seleccionado de las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, y un ADN que codifica el polipéptido,
- (iii) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 o la SEQ ID NO:15, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 30, respectivamente,
- (iv) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 10 o SEQ ID NO: 15 y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 30, respectivamente,
- (v) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 o SEQ ID NO:15 y un ADN

que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 30, respectivamente,

(vi) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO:13 y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 28, respectivamente,

(vii) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:12, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 27, respectivamente,

(viii) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 o la SEQ ID NO:12, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 27, respectivamente,

(ix) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:13, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 28, respectivamente,

(x) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:10 o la SEQ ID NO:14, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 25 o SEQ ID NO: 29, respectivamente,

(xi) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:8 o la SEQ ID NO:11, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 23 o SEQ ID NO: 26, respectivamente,

(xii) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:7 o la SEQ ID NO:11, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 22 o SEQ ID NO: 26, respectivamente,

(xiii) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:9 o la SEQ ID NO:15, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 24 o SEQ ID NO: 30, respectivamente,

(xiv) un polipéptido que comprende las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:20 o la SEQ ID NO:21, y un ADN que codifica el polipéptido, por ejemplo, un ADN que comprende las secuencias de nucleótidos de SEQ ID NO: 31 o SEQ ID NO: 32, respectivamente, y

(xv) un polipéptido derivado de cualquiera de los polipéptidos descritos en (i) a (xiv) comprendiendo la sustitución de uno o más aminoácidos en la región constante de la cadena pesada, o un fragmento de la misma, y un ADN que codifica el polipéptido o el fragmento del mismo.

Estos polipéptidos y ADN se pueden preparar, tal como se han descrito anteriormente, Utilizando una técnica de recombinación génica.

<Sumario de la presente invención>

La presente invención descrita anteriormente se resumirá a continuación.

(1) Un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad de las SEC ID NO: 1, 2 y 3, y una región variable de la cadena ligera que comprende las regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID NO: 4, 5 y 6, y tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1, o un fragmento de la misma.

(2) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15.

(3) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15.

(4) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15.

(5) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.

(6) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12.

(7) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12.

(8) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13.

(9) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende

la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14.

(10) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.

(11) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11.

(12) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15.

(13) El anticuerpo o el fragmento del mismo según (1), en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20, y la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21.

(14) El anticuerpo o el fragmento del mismo según cualquiera de (1) a (13), en el que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.

(15) El anticuerpo o el fragmento del mismo según cualquiera de (1) a (13), en el que el anticuerpo o el fragmento está conjugado con un agente antitumoral.

(16) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (15), en el que el anticuerpo comprende la sustitución de uno o más aminoácidos en la región constante de la cadena pesada del mismo.

(17) El anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (16), en el que el anticuerpo es un anticuerpo que carece de fucosa agregada a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada.

(18) Una composición de anticuerpo que comprende un anticuerpo de acuerdo con (17) y un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de (1) a (16) que tiene fucosa agregada a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada.

(19) Una célula que produce un anticuerpo de acuerdo con (17) o una composición de anticuerpo de acuerdo con (18).

(20) Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según cualquiera de (1) a (15), un anticuerpo de acuerdo con (16) o (17), o una composición de anticuerpo de acuerdo con (18) como principio activo.

(22) Un producto farmacológico de combinación que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con (20) o (21) y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.

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

(24) Un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con cualquiera de (1) a (16), un anticuerpo de acuerdo con (17), una composición de anticuerpo de acuerdo con (18), una composición farmacéutica de acuerdo con (20), o un producto farmacéutico de combinación de acuerdo con (22), para su uso en un procedimiento para tratar y/o prevenir un cáncer.

(25) El anticuerpo, fragmento, composición de anticuerpo, composición farmacéutica o producto farmacéutico de combinación para su uso de acuerdo con (24), en el que el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, o cáncer de cabeza y cuello.

Ejemplos

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

Ejemplo 1: Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 utilizando conejo

Se mezclaron 300 µg de proteína CAPRINA-1 humana preparada en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 con una cantidad igual de un adyuvante completo de Freund, y se usó como solución de antígeno por conejo. Se usó una mezcla con un adyuvante incompleto de Freund en la segunda o posterior inmunización. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada conejo de 12 semanas de edad, y, después, se administró 8 veces cada 2 a 3 semanas para completar la inmunización. Los linfocitos se obtuvieron del bazo de cada conejo extirpado 4 días después de la inmunización final y se mezclaron con células de mieloma de conejo 240E-W2 en una proporción de 1:2. Se añadió una solución de PEG (calentada a 37 °C) preparada mezclando 200 µl de un medio RPMI que contenía FBS al 10 % y 800 µl de PEG1500, y la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos en para fusión celular. Después de la centrifugación y eliminación del sobrenadante, las células se suspendieron en 300 ml de un medio RPMI que contenía FBS al 10 % suplementado con una solución de HAT (medio selectivo HAT) a una concentración del 2 % y se inocularon a 100 µl/pocillo en 80 placas de 96 pocillos. Los hibridomas generados por la fusión de las células de bazo y las células de mieloma de conejo se obtuvieron cultivando a 37 °C durante 7 días en condiciones de CO₂ al 5

%.

Los hibridomas se seleccionaron en función de la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas preparados con la proteína CAPRINA-1. Se añadió una solución de proteína CAPRINA-1 de 1 µg/ml a 100 µl/pocillo a las placas de 96 pocillos, y las placas se dejaron en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces. Después, se añadió una solución de seroalbúmina bovina (BSA) al 0,5 % a 400 µl/pocillo y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se eliminó y los pocillos se lavaron con 400 µl/pocillo de PBS-T tres veces. Después, cada sobrenadante de cultivo del hibridoma obtenido anteriormente se añadió a 100 µl/pocillo, y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces. Después, se añadió un anticuerpo anti-conejo marcado con HRP diluido 5.000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces. Después, se añadió una solución de sustrato TMB a 100 µl/pocillo y las placas se dejaron en reposo durante 15 a 30 minutos para la reacción cromogénica. Después del desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo, y los valores de absorbancia se midieron a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrómetro de absorción. Como resultado, se seleccionó una pluralidad de hibridomas que producen anticuerpos que exhibían altos valores de absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a 0,5 células/pocillo a placas de 96 pocillos y se cultivaron. Después de 1 semana, se observaron los hibridomas que formaban colonias únicas en los pocillos. Las células en estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas se seleccionaron basándose en la reactividad de los anticuerpos producidos por los hibridomas clonados con la proteína CAPRINA-1. Como resultado de evaluar la reactividad de cada anticuerpo con la proteína CAPRINA-1 mediante el mismo procedimiento anterior, se obtuvo una pluralidad de líneas de hibridoma que producen anticuerpos monoclonales de conejo que exhibían reactividad con la proteína CAPRINA-1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales de conejo que mostraron reactividad con la proteína CAPRINA-1 fueron seleccionados para detectar aquellos que exhiben reactividad con la superficie de las células cancerosas humanas en las que se expresó CAPRINA-1. Específicamente, se centrifugaron 2×10^5 células de cada línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 y una línea celular de cáncer de mama humano BT-474 (obtenida de ATCC) en cada tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, a los que luego se agregaron 100 µl del sobrenadante de cultivo de cada uno de los hibridomas. El tubo se dejó en reposo en hielo durante 1 hora. Después de lavar con PBS, a ello se añadió un anticuerpo anti-IgG de conejo (H + L) marcado con FITC o anti-IgG de conejo (H + L) marcado con Alexa 488 diluido 100 veces con PBS (-) que contiene FBS al 0,5 % (FBS al 0,5 %-PBS (-)) y el tubo se dejó en reposo en hielo durante 1 hora. Después de lavar con FBS al 0,5 %-PBS (-), las células se suspendieron en 0,2 µg/ml de yoduro de propidio y FBS al 0,5 %-PBS (-) y la intensidad de la fluorescencia se midió utilizando FACSCaliburTM o FACSVerseTM (Becton, Dickinson and Company). Por otro lado, el mismo procedimiento que el anterior se llevó a cabo utilizando un medio para el cultivo de hibridomas y la resultante se usó como muestra para un control negativo. Como resultado, se seleccionó un anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 que exhibió una intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control negativo, es decir, reaccionó fuertemente con la superficie celular de las células cancerosas QG56 y BT-474 al expresar CAPRINA-1.

A continuación, los fragmentos de amplificación de los genes que codifican la región variable como el anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 obtenido anteriormente se obtuvieron de acuerdo con el procedimiento descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526, y se analizaron para determinar sus secuencias de genes y las secuencias de aminoácidos codificadas por los mismos. Específicamente, se extrajo ARNm del hibridoma que producía el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo, y los genes de la región variable de la cadena pesada (VH) y la región variable de la cadena ligera (VL) de este anticuerpo se obtuvieron mediante RT-PCR utilizando cebadores específicos para las secuencias de la región variable de conejo. Estos genes se insertaron en vectores de clonación y sus respectivas secuencias de nucleótidos se determinaron de acuerdo con un procedimiento de rutina.

Se confirmó que el anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 resultante tenía una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO:20, consistiendo la región variable de la cadena pesada que contiene CDR1, CDR2 y CDR3 en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y que tenía una región variable de cadena ligera representada por la SEQ ID NO:21, consistiendo la región variable de la cadena pesada que contiene CDR1, CDR2 y CDR3 en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

A continuación, se confirmó la reactividad del anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 obtenido con varias células cancerosas humanas. El anticuerpo obtenido se hizo reaccionar con células cancerosas humanas que se había confirmado que expresaban el gen de CAPRINA-1, es decir, células de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-361), células de cáncer colorrectal (HT-29), células de cáncer de pulmón (QG56), células de cáncer de estómago (NCI-N87), células de cáncer de útero (HEC-1-A), células de cáncer de próstata (22Rv1), células de cáncer de páncreas (Panc10.5), células de cáncer de hígado (Hep3B), células de cáncer de ovario (SKOV3), células de cáncer de riñón (Caki-2), células de tumor cerebral (U-87MG), células cáncer de vejiga (T24 y HT-1376), células de cáncer de esófago (OE33), células de leucemia (OCI-AML5), células de linfoma (Ramos), células de cáncer de vesícula biliar (TGBC14TKB), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de melanoma (G-361), células de cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), células de tumor de Ewing (RD-ES), células de linfoma de Hodgkin (RPMI1666), células de

mesotelioma (NCI-H2452), células de mieloma múltiple (IM-9), células de cáncer de testículo (NT/D1), células de cáncer de tiroides (TT) o células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu) y la intensidad de fluorescencia se evaluó mediante citometría de flujo. Se recogieron 10^6 células de cada línea celular de cáncer en cada tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, y el sobrenadante de cultivo (100 μ l) del hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 obtenido anteriormente se añadió a cada tubo y se hizo reaccionar a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar con FBS al 0,5 %-PBS (-), se añadió un anticuerpo IgG de cabra anti-conejo (H + L) marcado con FITC (fabricados por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluido 50 veces con FBS al 0,5 %-PBS (-) y el tubo se dejó en reposo a 4 °C durante 60 minutos. Después de lavar con FBS al 0,5 %-PBS (-), las células se suspendieron en FBS al 0,5 %-PBS(-) que contenía 0,2 μ g/ml (concentración final) de yoduro de propidio, y la intensidad de fluorescencia se midió utilizando FACSCalibur^(TM) o FACSVerse^(TM) (Becton, Dickinson and Company). Por otro lado, el mismo procedimiento que el anterior se llevó a cabo para un control negativo utilizando un medio para el cultivo de hibridomas y la resultante preparada se usó como muestra para un control negativo. Como resultado, en todas las células cancerosas utilizadas en la evaluación, la intensidad de la fluorescencia cuando se usó el sobrenadante de cultivo del hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 de conejo fue más fuerte que cuando se usó el control negativo. A partir de estos resultados, se confirmó que el anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 reaccionaba con CAPRINA-1 en la superficie de la membrana de la célula cancerosa de las células cancerosas humanas.

Ejemplo 2: Preparación de anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 quimérico de ser humano-conejo

El gen para expresar la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:20 del anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 confirmado en el Ejemplo 1 y el gen para expresar la región variable de la cadena ligera representada por la SEC ID NO 21 del mismo, se insertaron respectivamente en un vector para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto génico de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana y un vector para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto génico de la región constante de la cadena ligera de la IgG1 humana. Los dos vectores de expresión recombinantes preparados se transfirieron a células de mamífero de acuerdo con un procedimiento de rutina y se obtuvo un sobrenadante de cultivo que contenía un anticuerpo anti-CAPRINA-1 quimérico de ser humano-conejo (anticuerpo quimérico de ser humano-conejo). El sobrenadante de cultivo obtenido que contenía el anticuerpo quimerizado se purificó de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS(-) y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 μ m (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar el anticuerpo quimérico.

Ejemplo 3: Preparación de anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 humanizados

A continuación, sobre la base de la información sobre las secuencias de aminoácidos y las secuencias de nucleótidos de CDR1 a CDR3 en la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal de conejo anti-CAPRINA-1 confirmado en el Ejemplo 1 y de CDR1 a CDR3 en la región variable de la cadena ligera del mismo, se diseñó una secuencia de nucleótidos para poder expresar la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7 en la que las CDR1, CDR2 y CDR3 de la s región variable de cadena pesada consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente. Esto se insertó en un vector para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto génico de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana. De manera similar, se diseñó una secuencia de nucleótidos para poder expresar la secuencia de aminoácidos de una región variable de cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 en la que las CDR1, CDR2 y CDR3 de la s región variable de cadena ligera consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente. Esto se insertó en un vector para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto génico de la región constante de la cadena ligera de la IgG1 humana. Estos dos vectores de expresión recombinante se transfirieron a células de mamífero de acuerdo con un procedimiento de rutina, y se obtuvo un sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo N.º 0 humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11.

De manera similar, se obtuvo un sobrenadante de cultivo que contenía el anticuerpo humanizado N.º 1 consistente en la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:8 en la cual las CDR1, CDR2, and CDR3 de la región variable de la cadena pesada consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3, respectivamente, y la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11.

De manera similar, adicionalmente se obtuvieron los sobrenadantes de cultivo que contienen los siguientes anticuerpos humanizados N.º 2 a 10:

el anticuerpo N.º 2 humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:8 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:12 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente; el anticuerpo N.º 3 humanizado que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

pesada representada por la SEQ ID NO:8 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:13 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente; el anticuerpo humanizado N.º 4 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena

pesada representada por la SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:12;

el anticuerpo humanizado N.º 5 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:15 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente;

el anticuerpo humanizado N.º 7 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:8 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:15;

el anticuerpo humanizado N.º 8 que consiste en la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:9 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:15.

el anticuerpo humanizado N.º 9 que consiste en la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:10 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena pesada consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:14 en la cual las CDR1, CDR2 y CDR3 de la región variable de la cadena ligera consistían en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente; y

el anticuerpo humanizado N.º 10 que consiste en la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:10 y la secuencia de aminoácidos de longitud completa de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:15;

Los sobrenadantes de cultivo obtenidos que contenían los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 se purificaron cada uno de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS (-) y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar los anticuerpos humanizados.

Ejemplo 4: Especificidad de antígeno del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 y reactividad de los mismos con células cancerosas

A continuación, la reactividad específica del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo preparado en el Ejemplo 2 y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 preparados en el Ejemplo 3 con la proteína CAPRINA-1 se confirmó mediante ELISA de acuerdo con un procedimiento de rutina. Específicamente, en primer lugar, se añadió una solución de PBS que contenía 5 µg/ml de proteína CAPRINA-1 a 100 µl/pocillo en placas de 96 pocillos, y las placas se dejaron en reposo a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó con PBS-T. Después, se añadió una solución de bloqueo que consistía en una solución de PBS que contenía leche desnatada al 5 % a 400 µl/pocillo, y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución se retiró y cada pocillo se lavó con PBS-T. A continuación, se añadió una solución que contenía cada uno de los anticuerpos quiméricos de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 ajustados a 1 µg/ml con PBS que contenía 0,2 % de leche desnatada a 50 µl/pocillo en cada pocillo, y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Como controles negativos se prepararon un pocillo en el que se añadió un anticuerpo IgG humano del que se había confirmado que no reaccionaba con la proteína CAPRINA-1 a la misma concentración de anticuerpo que la anterior y un pocillo al que no se añadió anticuerpo. Cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces. Después, se añadió un anticuerpo anti-IgG humano marcado con HRP diluido 3000 veces con PBS que contenía 0,2 % de leche desnatada a 50 µl/pocillo, y las placas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces. Después, se añadió una solución de sustrato TMB (fabricada por Thermo Fischer Scientific, Inc.) a 100 µl/pocillo, y las placas se dejaron en reposo durante de 1 a 30 minutos para la reacción cromogénica. Después del desarrollo del color, la reacción se terminó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo, y los valores de absorbancia se midieron a 450 nm y 630 nm utilizando un espectrómetro de absorción. Además, los pocillos en los que no se inmovilizó la proteína CAPRINA-1 (pocillos no inmovilizados) se prepararon juntos y cada anticuerpo se añadió y se analizó de manera similar. Como resultado, el valor de absorbancia del pocillo utilizado como control negativo al que se agregó un anticuerpo IgG humano confirmado que no reaccionaba con la proteína CAPRINA-1, fue tan baja como la del pocillo al que no se agregó anticuerpo, mientras que los pocillos a los que se añadió los respectivos anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 exhibieron valores de absorbancia equivalentemente altos. El anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 en los pocillos en los que no se inmovilizó la proteína CAPRINA-1 simplemente mostraron un valor de absorbancia equivalente al del control negativo. A partir de estos resultados, se confirmó que el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los

anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 reaccionaban específicamente con la proteína CAPRINA-1.

A continuación, se confirmó la reactividad del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 que reaccionan específicamente con la proteína CAPRINA-1, con varias células cancerosas humanas y células de cáncer de ratón. El anticuerpo quimérico de ser humano-conejo purificado y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 se hicieron reaccionar cada uno con células cancerosas humanas que se había confirmado que expresaban el gen de CAPRINA-1, es decir, células de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-361), células de cáncer colorrectal (HT-29), células de cáncer de pulmón (QG56), células de cáncer de estómago (NCI-N87), células de cáncer de útero (HEC-1-A), células de cáncer de próstata (22Rv1), células de cáncer de páncreas (Panc10.5), células de cáncer de hígado (Hep3B), células de cáncer de ovario (SKOV3), células de cáncer de riñón (Caki-2), células de tumor cerebral (U-87MG), células de cáncer de vejiga (T24 y HT-1376), células de cáncer de esófago (OE33), células de leucemia (OCI-AML5), células de linfoma (Ramos), células de cáncer de vesícula biliar (TGBC14TKB), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de melanoma (G-361), células de cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), células de tumor de Ewing (RD-ES), células de linfoma de Hodgkin (RPMI1666), células de mesotelioma (NCI-H2452), células de mieloma múltiple (IM-9), células de cáncer de testículo (NT/D1), células de cáncer de tiroides (TT) o células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu) y la intensidad de fluorescencia se evaluó mediante citometría de flujo. Específicamente, se recogieron 5×10^5 células de cada línea celular de cáncer en cada tubo de microcentrifuga de 1,5 ml, y cada uno del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 se añadieron a 50 µg/ml (concentración final) a cada tubo y reaccionó a 4 °C durante 1 hora. Después de lavar con FBS al 0,5 %-PBS (-) dos veces, se añadió un anticuerpo IgG antihumano de cabra marcado con Alexa 488 (H + L) (fabricado por Life Technologies Corp.) diluido 100 veces con FBS al 0,5 %-PBS (-), y el tubo se dejó en reposo a 4 °C durante 60 minutos. Después de lavar con FBS al 0,5 %-PBS (-), las células se suspendieron en FBS al 0,5 %-PBS(-) que contenía 0,2 µg/ml (concentración final) de yoduro de propidio, y la intensidad de fluorescencia se midió utilizando FACSCaliburTM o FACSVerseTM (Becton, Dickinson and Company). Por otro lado, el mismo procedimiento que el anterior se llevó a cabo utilizando un medio para el cultivo de hibridomas y la resultante preparada se usó como control negativo. Como resultado, en todas las células cancerosas utilizadas en la evaluación, la intensidad de fluorescencia del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 fue más fuerte que en el caso de usar el control negativo. A partir de estos resultados, se confirmó que el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 reaccionaban con la proteína CAPRINA-1 expresada sobre la superficie de membrana de las células cancerosas humanas.

Ejemplo 5: Actividad antitumoral del anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 contra varias células cancerosas humanas

A continuación, el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo preparado en el Ejemplo 2 y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10 preparados en el Ejemplo 3 se evaluaron por sus efectos antitumorales en varias células cancerosas humanas sobre la base de la actividad ADCC.

Los siguientes anticuerpos anti-CAPRINA-1 se usaron como anticuerpos comparativos para el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10:

anticuerpos descritos en el documento WO2010/016526, es decir, el anticuerpo comparativo 1 que tiene una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:26 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:27 en esta bibliografía, el anticuerpo comparativo 2 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:28 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:29 en la misma, el anticuerpo comparativo 3 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:30 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:31 en la misma, el anticuerpo comparativo 4 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:32 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:33 en la misma, el anticuerpo comparativo 5 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:34 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:35 en la misma, el anticuerpo comparativo 6 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:36 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:37 en la misma, el anticuerpo comparativo 7 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:38 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:39 en la misma, el anticuerpo comparativo 8 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:40 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:41 en la misma, el anticuerpo comparativo 9 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:42 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:43 en la misma, el anticuerpo comparativo 10 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:44 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:45 y un anticuerpo comparativo 11 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:46 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:47 en la misma;

anticuerpos descritos en el documento WO2011/096517, es decir, el anticuerpo comparativo 12 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:47 en esta bibliografía, y el anticuerpo comparativo 13 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 53 en la misma;

anticuerpos descritos en el documento WO2011/096528, es decir, el anticuerpo comparativo 14 que tiene una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO:43 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID

región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:11 y una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO:15 en esta bibliografía, y el anticuerpo comparativo 48 que tiene una región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO:21 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO:25 en ella.

Los anticuerpos comparados mencionados anteriormente (anticuerpos comparativos 1 a 48) se prepararon cada uno como sigue: el gen para expresar la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada y el gen para expresar la región variable de la cadena ligera se insertaron, respectivamente, en un vector pcDNA4/myc-His para la expresión en células de mamíferos (fabricado por Life Technologies Corp.) con un la inserción génica de la región constante de la cadena pesada de IgG1 humana y un vector pcDNA3.1/myc-His para la expresión en células de mamífero (fabricado por Life Technologies Corp.) que tiene una inserción génica de la región constante de la cadena ligera de la IgG1 humana; los dos vectores de expresión recombinantes preparados se transfirieron a células de mamífero de acuerdo con un procedimiento de rutina; el anticuerpo quimerizado humano o humanizado obtenido se purificó utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.); el tampón se reemplazó con PBS (-); y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.).

Como controles negativos se prepararon un pocillo al que se añadió un anticuerpo de control de isotipo, un pozo al que no se añadió anticuerpo y un pocillo al que se añadió un anticuerpo que reacciona con la proteína CAPRINA-1 pero que no muestra reactividad con la superficie de las células cancerosas humanas sobre las que se expresó CAPRINA-1. Cada anticuerpo se añadió a 5 µg/ml (concentración final) a placas de 96 pocillos con fondo en V.

Las células NK humanas separadas de las células mononucleares de sangre periférica humanas utilizando un procedimiento de rutina se usaron como células efectoras. Las células mononucleares de sangre periférica humanas se separaron utilizando una solución de separación por gravedad específica Histopaque para la separación de células mononucleares de sangre periférica (Sigma-Aldrich Corp.) y se hicieron reaccionar con anticuerpos (anticuerpo CD3 antihumano, anticuerpo anti-CD20 humano, anticuerpo anti-CD19 humano, anticuerpo anti-CD11c humano, anticuerpo anti-HLA-DR (BD Pharmingen) marcado con un colorante fluorescente FITC. Una población celular que contenía células NK que no se tiñeron con estos anticuerpos se separó usando un clasificador de células (FACS Vantage SE (Becton, Dickinson and Company)). Como alternativa, se utilizó una población celular separada utilizando un kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec K.K.). Se prepararon placas de 96 pocillos con fondo en V a las que se añadió cada uno de los anticuerpos y las células NK humanas se añadieron a 0,4 a 2,0 x 10⁵ células/pocillo.

Las células de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-361), células de cáncer colorrectal (HT-29), células de cáncer de pulmón (QG56), células de cáncer de estómago (NCI-N87), células de cáncer de útero (HEC-1-A), células de cáncer de próstata (22Rv1), células de cáncer de páncreas (Panc10.5), células de cáncer de hígado (Hep3B), células de cáncer de ovario (SKOV3), células de cáncer de riñón (Caki-2), células de tumor cerebral (U-87MG), células cáncer de vejiga (T24 y HT-1376), células de cáncer de esófago (OE33), células de leucemia (OCI-AML5), células de linfoma (Ramos), células de cáncer de vesícula biliar (TGBC14TKB), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de melanoma (G-361), cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), tumor de Ewing (RD-ES), linfoma de Hodgkin (RPMI1666), mesotelioma (NCI-H2452), mieloma múltiple (IM-9), cáncer de testículo (NT/D1), cáncer de tiroides (TT) y cáncer de cabeza y cuello (FaDu) se utilizaron como células diana. Se recogieron 10⁶ células de cada línea celular de cáncer humano mencionada anteriormente en cada tubo centrífugo de 50 ml. Se añadieron 100 µCi de cromo 51 (fabricado por PerkinElmer, Inc.) y el tubo se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, las células se lavaron con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % tres veces, se añadieron a 2 x 10 células/pocillo a las placas de 96 pocillos con fondo en V a las que se añadieron las células efectoras y cada anticuerpo como se ha descrito anteriormente, y se hizo reaccionar a 37 °C durante 4 horas en condiciones de CO₂ al 5 %. Después de la reacción, se recuperaron 50 µl de un sobrenadante de cultivo que contenía cromo 51 liberado en el sobrenadante de cultivo de células cancerosas dañadas de cada pocillo, se añadieron a LumaPlate-96 (fabricado por PerkinElmer, Inc.) con el fondo de cada pocillo recubierto con un centelleador sólido y se secaron. La cantidad de cromo 51 liberado en el sobrenadante del cultivo de las células cancerosas dañadas se midió para calcular los efectos antitumorales de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 en las células cancerosas.

Como resultado, para las células de cáncer de mama (BT-474), el anticuerpo humanizado N.º 7, el anticuerpo humanizado N.º 10 y el anticuerpo humanizado N.º 6 mostraron un efecto antitumoral del 54 % o superior, el anticuerpo humanizado N.º 3, el anticuerpo humanizado N.º 4, el anticuerpo humanizado N.º 2 y el anticuerpo humanizado N.º 5 exhibieron 50 % o más de actividad, y el anticuerpo humanizado N.º 9, el anticuerpo humanizado N.º 1, el anticuerpo humanizado N.º 0, el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y el anticuerpo humanizado n.º 8 mostraron una actividad del 46 % o superior. Por el contrario, todos los anticuerpos comparativos 1 a 48 mostraron una actividad del 25 % o inferior, y todos los grupos de control negativo mostraron una actividad del 10 % o menor.

Para las células de cáncer de mama (MDA-MB-361), el anticuerpo humanizado N.º 7, el anticuerpo humanizado N.º 10 y el anticuerpo humanizado N.º 6 mostraron un efecto antitumoral del 52 % o superior, el anticuerpo humanizado N.º 3, el anticuerpo humanizado N.º 4, el anticuerpo humanizado N.º 2 y el anticuerpo humanizado N.º 5 exhibieron 45 % o más de actividad, y el anticuerpo humanizado N.º 9, el anticuerpo humanizado N.º 1, el anticuerpo humanizado N.º 0, el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y el anticuerpo humanizado n.º 8 mostraron una actividad del 40 % o superior. Por el contrario, todos los anticuerpos comparativos 1 a 48 mostraron una actividad del 25 % o inferior,

el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y el anticuerpo humanizado n. ° 8 mostraron una actividad del 30 % o superior. Por el contrario, todos los anticuerpos comparativos 1 a 48 mostraron una actividad del 15 % o inferior, y todos los grupos de control negativo mostraron una actividad del 5 % o menor.

- 5 Para las células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu), el anticuerpo humanizado N.° 7, el anticuerpo humanizado N.° 10 y el anticuerpo humanizado N.° 6 mostraron un efecto antitumoral del 50 % o superior, el anticuerpo humanizado N.° 3, el anticuerpo humanizado N.° 4, el anticuerpo humanizado N.° 2 y el anticuerpo humanizado N.° 5 exhibieron 40 % o más de actividad, y el anticuerpo humanizado N.° 9, el anticuerpo humanizado N.° 1, el anticuerpo humanizado N.° 0, el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo y el anticuerpo n. ° 8 mostraron una actividad del 35 % o superior.
- 10 Por el contrario, todos los anticuerpos comparativos 1 a 48 mostraron una actividad del 20 % o inferior, y todos los grupos de control negativo mostraron una actividad del 8 % o menor.

Estos resultados demostraron que los anticuerpos humanizados N.° 0 a N.° 10 y el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo exhiben un efecto antitumoral significativamente más fuerte en el cáncer de mama, cáncer de riñón, 15 cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides o cáncer de cabeza y cuello que el de los anticuerpos comparativos.

20 Por otra parte, los anticuerpos humanizados N.° 0 a N.° 10 y el anticuerpo quimérico de ser humano-conejo mostraron una actividad antitumoral significativamente más fuerte contra el cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, 25 sarcoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de cabeza y cuello como se ha descrito anteriormente que el de todos los anticuerpos contra CAPRINA-1 en los Ejemplos de los documentos WO2010/016526, WO2011/096517, WO2011/096528, WO2011/096519, WO2011/096533, WO2011/096534, WO2011/096535, WO2013/018886, WO2013/018894, WO2013/018892, WO2013/018891, WO2013/018889, WO2013/018883, WO2013/125636, 30 WO2013/125654, WO2013/125630, WO2013/125640, WO2013/147169 y WO2013/147176.

El efecto antitumoral se mostró como actividad citotóxica contra las líneas celulares de cáncer que se determinó mezclando cada anticuerpo contra CAPRINA-1, las células efectoras y las células diana incorporadas al cromo 51, 35 cultivando las células durante 4 horas y midiendo la cantidad de cromo 51 liberado en el medio después del cultivo, seguido del cálculo de acuerdo con la siguiente fórmula:

*Fórmula: Actividad citotóxica (%) = (Cantidad de cromo 51 liberado de las células diana cuando se añaden el anticuerpo contra CAPRINA-1 y las células efectoras - Cantidad de cromo 51 liberado de forma natural desde las células diana)/(Cantidad de cromo 51 liberado desde la diana células a las que se añade ácido clorhídrico 1 N - 40 Cantidad de cromo 51 liberado de forma natural desde las células diana) × 100.

Ejemplo 6-1: Preparación de anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 humanizados en los que se sustituyó el aminoácido en la región constante de la cadena pesada

45 Los anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen una región constante de la cadena pesada descrita en la SEQ ID NO:33 en la que una porción de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada de los anticuerpos humanizados N.° 0, N.° 2, N.° 3, N.° 4, N.° 5, N.° 6, N.° 7, N.° 8, N.° 9, o N.° 10 obtenidos en el Ejemplo 3 se sustituyó (en lo sucesivo, denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería). Se sintetizó un ADN que codifica la 50 secuencia de aminoácidos de una cadena pesada que tiene la región constante de la cadena pesada mencionada anteriormente y una región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7, y se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero de acuerdo con una procedimiento rutinario. Adicionalmente, un ADN que codifica los aminoácidos de una región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero que tienen un inserto de un gen que codifica la región constante de la cadena ligera de IgG1 humana para preparar un vector de expresión recombinante. Los dos vectores de 55 expresión recombinantes preparados se transfirieron a células de mamífero de acuerdo con un procedimiento de rutina y se obtuvo un sobrenadante de cultivo del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñado por ingeniería genética N.° 0 del anticuerpo humanizado N.° 0. Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería genética N.° 1, N.° 2, N.° 3, N.° 4, N.° 5, N.° 6, N.° 7, N.° 8, N.° 9 y N.° 10 descritos en el Ejemplo 3 se obtuvieron además de la misma manera que antes con respecto a los anticuerpos humanizados N.° 1, 60 N.° 2, N.° 3, N.° 4, N.° 5, N.° 6, N.° 7, N.° 8, n.° 9 y n.° 10, respectivamente. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos que contenían los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería genética N.° 0 a N.° 10 se purificaron cada uno de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS(-) y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería. 65

A continuación, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen una región constante de cadena pesada descrita en la

SEQ ID NO:34, en la que una porción de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada del anticuerpo humanizado N.º 0, N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9, o N.º 10 obtenidos en el Ejemplo 3 se sustituyó (en lo sucesivo, denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería). Se sintetizó un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada que tiene la región constante de la cadena pesada mencionada anteriormente y una región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7, y se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero de acuerdo con un procedimiento rutinario. Además, como se ha preparado anteriormente, un ADN que codifica los aminoácidos de una región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero que tienen un inserto de un gen que codifica la región constante de la cadena ligera de IgG1 humana para preparar un vector de expresión recombinante. Estos dos vectores de expresión recombinantes se transfirieron a células de mamífero de acuerdo con un procedimiento de rutina y se obtuvo un sobrenadante de cultivo del anticuerpo n.º 0 anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñado por ingeniería genética. Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9 y N.º 10 descritos en el Ejemplo 3, se obtuvieron además de la misma manera que antes para los anticuerpos humanizados N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, n.º 9 y n.º 10, respectivamente. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos que contenían los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 se purificaron cada uno de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS(-) y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética.

Ejemplo 6-2: Preparación de anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen una cadena de azúcar sin adición de fucosa a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas a la región constante de la cadena pesada

A continuación, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido unidas a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo humanizado N.º 0, N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9 o N.º 10 obtenidos en el Ejemplo 3 (en lo sucesivo, denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería) se obtuvieron mediante el procedimiento siguiente: un vector de expresión de células de mamífero que contienen el gen de resistencia a la neomicina que alberga un gen de la GDP-6-desoxinosina-D-lixo-4-hexulosa reductasa (RMD), que es una enzima que no cataliza la reacción de conversión de GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa en GDP-L-fucosa, se transfirió a la línea celular de mamífero de células CHO de acuerdo con un procedimiento de rutina usando un reactivo de transfección FreeStyle(TM) MAX Reagent (Life Technologies Corp.). Las células CHO transfectadas se cultivaron en un medio que contenía G-418 para preparar un conjunto estable de células CHO que expresan RMD. De este conjunto estable, se clonaron 7 células CHO que expresaban constitutivamente RMD mediante el procedimiento de dilución límite. El nivel de expresión del gen RMD en cada una de las 7 células RMD-CHO clonadas se evaluó tres veces cada dos semanas mediante PCR cuantitativa para seleccionar las células CHO que expresaban de forma constitutiva y estable el gen RMD (células RMD-CHO). De la misma manera que en el Ejemplo 3, el gen que codificaba la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7 y el gen que codificaba los aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se transfirieron respectivamente a través de un vector para la expresión en células de mamífero que tenían un inserto génico de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana y un vector para la expresión en células de mamífero que tenían un inserto génico de la región constante de la cadena ligera de la IgG1 humana a las células RMD-CHO que expresaban constitutivamente RMD de acuerdo con un procedimiento de rutina, y se obtuvo un sobrenadante de cultivo que contenía anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñado por ingeniería genética N.º 0. Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9 y N.º 10 descritos en el Ejemplo 3, se obtuvieron además de la misma manera que antes para los anticuerpos humanizados N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, n.º 9 y n.º 10, respectivamente. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos que contenían los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados mediante ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 se purificaron cada uno de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS (-) y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar una composición de anticuerpo que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñado por ingeniería genética n.º 0. De manera similar, se obtuvieron productos purificados de anticuerpos que contenían anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III modificados por ingeniería genética N.º 1 a N.º 10. La proporción del anticuerpo anti-CAPRINA-1 que tenía una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas a la región constante de la cadena pesada, contenida en cada una de estas composiciones de anticuerpos purificadas se evaluó utilizando LabChip® GXII (PerkinElmer, Inc.) y, en consecuencia, fue del 80 % o superior en todos los casos.

De la misma manera que en el Ejemplo 3, el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada representada por la SEQ ID NO:7 y el gen que codifica los aminoácidos de la región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se transfirieron, respectivamente, a través de un vector que contenía el gen de resistencia a la higromicina para la expresión en células de mamífero que tienen un inserto génico de la región constante de la cadena pesada de la IgG1 humana y un vector que contiene el gen de resistencia a la

higromicina para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto genético de la región constante de la cadena ligera de la IgG1 humana a las células RMD-CHO de acuerdo con un procedimiento de rutina, y las células resultantes se cultivaron en un medio que contenía higromicina B para preparar un grupo estable que expresaba el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñado por ingeniería genética N.º 0. De este conjunto estable, las células que expresan de forma constitutiva y estable el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo III N.º 0 diseñado por ingeniería genética se prepararon mediante el procedimiento de dilución límite. La proporción del anticuerpo anti-CAPRINA-1 que tenía una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas a la región constante de la cadena pesada, contenidas en cada una de las composiciones de anticuerpos purificados que comprenden los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 producidos por las células respectivas se evaluaron usando LabChip® GXII (PerkinElmer, Inc.) y, en consecuencia, fue del 80 % o superior en todos los casos.

Ejemplo 6-3: Preparación de anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen sustitución de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada y que tienen una cadena de azúcar sin adición de fucosa a la N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido unidas a la región constante de la cadena pesada

A continuación, se prepararon anticuerpos anti-CAPRINA-1 que tienen una región constante de la cadena pesada descrita en la SEQ ID NO:34 en la que una porción de aminoácidos en la región constante de la cadena pesada del anticuerpo humanizado N.º 0, N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, n.º 9 o N.º 10 descritos en el ejemplo 3 se sustituyó y que tienen una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósido unidas a la región constante de la cadena pesada del anticuerpo (en lo sucesivo denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería genética). Un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada que tiene la región constante variante de la cadena pesada preparada en el Ejemplo 6-1 y la región variable de la cadena pesada de la IgG1 humana representada por la SEQ ID NO:7 se sintetizó y se insertó en un vector para la expresión en células de mamífero según un procedimiento de rutina, mientras que un ADN que codifica los aminoácidos de una región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se sintetizó e insertó en un vector para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto génico que codifica los aminoácidos de la región constante de la cadena ligera de IgG1 de ser humano y los vectores resultantes se transfirieron a las células RMD-CHO que expresan de manera constitutiva GDP-6-desoxi-D-lixo-4-hexulosa reductasa (RMD) preparada en el Ejemplo 6-2. Se obtuvo un sobrenadante de cultivo del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñado por ingeniería genética N.º 0 del anticuerpo humanizado N.º 0. Los sobrenadantes de cultivo que contienen anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9, y N.º 10 se obtuvieron además de la misma manera que antes con respecto a los anticuerpos humanizados N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, n.º 9 y n.º 10, respectivamente, descritos en el Ejemplo 3. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos que contenían los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV de ingeniería N.º 0 a N.º 10 se purificaron cada uno de acuerdo con un procedimiento de rutina utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.). El tampón se reemplazó con PBS (-), y la resultante se filtró a través de un filtro de 0,22 µm (fabricado por Merck Millipore Corp.) para preparar una composición de anticuerpo que contiene el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo IV N.º 0 diseñado por ingeniería genética. De manera similar, Se obtuvieron productos purificados de anticuerpos que contenían anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV N.º 1 a N.º 10. La proporción del anticuerpo anti-CAPRINA-1 que tenía una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas a la región constante de la cadena pesada, contenida en cada una de estas composiciones de anticuerpos purificadas se evaluó utilizando LabChip® GXII (PerkinElmer, Inc.) y, en consecuencia, fue del 80 % o superior en todos los casos.

Un ADN que codifica la secuencia de aminoácidos de una cadena pesada que tiene la región constante de la cadena pesada modificada preparada en el Ejemplo 6-1 y la región variable de la cadena pesada de la IgG1 humana representada por la SEQ ID NO:7 se sintetizó e insertó en un vector que contiene el gen de resistencia a la higromicina para la expresión en células de mamíferos de acuerdo con un procedimiento de rutina, mientras que un ADN que codifica los aminoácidos de una región variable de la cadena ligera representada por la SEQ ID NO:11 se sintetizó e insertó en un vector que contiene el gen de resistencia a la higromicina para la expresión en células de mamíferos que tienen un inserto de un gen que codifica los aminoácidos de la región constante de cadena ligera de la IgG1 humana y los vectores resultantes se transfirieron a las células. Las células se cultivaron en un medio que contenía higromicina B para preparar un grupo estable que expresaba el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo IV modificado por ingeniería genética N.º 0. De este conjunto estable, las células que expresan de forma constitutiva y estable el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo IV n.º 0 diseñado por ingeniería genética se prepararon mediante el procedimiento de dilución límite. Las células que expresan de manera constitutiva y estable los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados mediante ingeniería N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, n.º 9, y N.º 10 se prepararon adicionalmente de la misma manera que antes con respecto a los anticuerpos humanizados N.º 1, N.º 2, N.º 3, N.º 4, N.º 5, N.º 6, N.º 7, N.º 8, N.º 9 y N.º 10 descritos en el Ejemplo 3, respectivamente. La proporción del anticuerpo anti-CAPRINA-1 que tenía una cadena de azúcar sin fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar entre todas las cadenas de azúcar unidas a N-glucósidos unidas a la región constante de la cadena pesada, contenidas en cada una de las composiciones de anticuerpos purificados que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV modificados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 producidos por las células respectivas se evaluaron usando

LabChip® GXII (PerkinElmer, Inc.) y, en consecuencia, fue del 80 % o superior en todos los casos.

Ejemplo 7: Especificidad antigénica de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo modificado y su reactividad con células cancerosas

La reactividad específica de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 (en lo sucesivo, denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñado por ingeniería genética) preparados en los Ejemplos 6-1 a 6-3 con la proteína CAPRINA-1 se confirmaron de la misma manera que en el Ejemplo 4. Como resultado, el valor de absorbancia del pocillo al que se agregó un anticuerpo IgG humano que se confirmó que no reaccionaba con la proteína CAPRINA-1, utilizado como control negativo, fue tan baja como la del pocillo al que no se agregó anticuerpo, mientras que todos los pocillos, respectivamente, a los que se añadieron anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética exhibieron valores de absorbancia equivalentemente altos. Todos los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética en los pocillos en los que no se inmovilizó la proteína CAPRINA-1 simplemente mostraron un valor de absorbancia equivalente al del control negativo. A partir de estos resultados, se confirmó que todos los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética reaccionan específicamente con la proteína CAPRINA-1.

A continuación, la reactividad de cada anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética con varias células cancerosas humanas se confirmó de la misma manera que en el Ejemplo 4. Las células de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-361), células de cáncer colorrectal (HT-29), células de cáncer de pulmón (QG56), células de cáncer de estómago (NCI-N87), células de cáncer de útero (HEC-1-A), células de cáncer de próstata (22Rv1), células de cáncer de páncreas (Panc10.5), células de cáncer de hígado (Hep3B), células de cáncer de ovario (SKOV3), células de cáncer de riñón (Caki-2), células de tumor cerebral (U-87MG), células cáncer de vejiga (T24 y HT-1376), células de cáncer de esófago (OE33), células de leucemia (OCI-AML5), células de linfoma (Ramos), células de cáncer de vesícula biliar (TGBC14TKB), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de melanoma (G-361), células de cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), células de tumor de Ewing (RD-ES), células de linfoma de Hodgkin (RPMI1666), células de mesotelioma (NCI-H2452), células de mieloma múltiple (IM-9), células de cáncer de testículo (NT/D1), células de cáncer de tiroides (TT) y células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu) se usaron en esa evaluación. Como resultado, la intensidad de fluorescencia de cada anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética fue más fuerte en todas las células cancerosas utilizadas en la evaluación que en el caso de usar el control negativo. A partir de estos resultados, se confirmó que todos los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética reaccionan específicamente con la proteína CAPRINA-1 presente en la superficie de la membrana de las células cancerosas humanas.

Ejemplo 8: Actividad antitumoral del anticuerpo anti-CAPRINA-1 de tipo diseñado por ingeniería genética dirigido contra varias células cancerosas humanas

Los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñado por ingeniería genética (los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 (en lo sucesivo, denominados anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñado por ingeniería genética) preparados en los Ejemplos 6-1 a 6-3 se evaluaron para determinar sus efectos antitumorales sobre varias células de cáncer humano sobre la base de la actividad ADCC de la misma manera que en el Ejemplo 5. Como controles negativos se prepararon un pocillo al que se añadió un anticuerpo de control de isotipo, un pozo al que no se añadió anticuerpo y un pocillo al que se añadió un anticuerpo que reacciona con la proteína CAPRINA-1 pero que no muestra reactividad con la superficie de las células cancerosas humanas sobre las que se expresó CAPRINA-1. Los anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10, que eran los correspondientes anticuerpos anti-CAPRINA-1 no diseñados por ingeniería genética, se utilizaron como anticuerpos comparativos. Cada anticuerpo se añadió a 0,01 a 1 µg/ml (concentración final) a las placas de 96 pocillos con fondo en V.

Las células de cáncer de mama (BT-474 y MDA-MB-361), células de cáncer colorrectal (HT-29), células de cáncer de pulmón (QG56), células de cáncer de estómago (NCI-N87), células de cáncer de útero (HEC-1-A), células de cáncer de próstata (22Rv1), células de cáncer de páncreas (Panc10.5), células de cáncer de hígado (Hep3B), células de cáncer de ovario (SKOV3), células de cáncer de riñón (Caki-2), células de tumor cerebral (U-87MG), células cáncer de vejiga (T24 y HT-1376), células de cáncer de esófago (OE33), células de leucemia (OCI-AML5), células de linfoma (Ramos), células de cáncer de vesícula biliar (TGBC14TKB), células de fibrosarcoma (HT-1080), células de melanoma (G-361), células de cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), células de tumor de Ewing (RD-ES), Las células de linfoma de Hodgkin (RPMI1666), células de mesotelioma (NCI-H2452), células de mieloma múltiple (IM-9), células de cáncer de testículo (NT/D1), células de cáncer de tiroides (TT) y células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu) se usaron como células diana. Se recogieron 10⁶ células de cada línea celular de cáncer humano mencionada anteriormente en

cada tubo centrífugo de 50 ml. Se añadieron 100 µCi de cromo 51 (fabricado por PerkinElmer, Inc.) y el tubo se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, las células se lavaron con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 % tres veces, se añadió a 2×10^5 células/pocillo a las placas de 96 pocillos con fondo en V a las que se añadió cada uno de los anticuerpos, y se hizo reaccionar.

5 Las células NK humanas separadas de las células mononucleares de sangre periférica humanas utilizando un procedimiento de rutina se usaron como células efectoras. Las células NK humanas añadidas a $0,4$ a $2,0 \times 10^5$ células/pocillo a las placas de 96 pocillos con fondo en V a las que se agregaron y reaccionaron cada uno de los anticuerpos y las células diana, se prepararon y reaccionaron a 37 °C durante 4 horas en condiciones de 5 % de CO₂.
10 Después de la reacción, Se recuperaron 50 µl de un sobrenadante de cultivo que contenía cromo 51 liberado de células cancerosas dañadas de cada pocillo. La cantidad de cromo 51 liberado en el sobrenadante del cultivo de las células cancerosas dañadas se midió de la misma manera que en el Ejemplo 5 para calcular los efectos antitumorales de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 en las células cancerosas.

15 Como resultado, para las células de cáncer de mama (BT-474), los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñados por ingeniería genética, es decir, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 (exhibieron cada uno un efecto antitumoral más fuerte que el de los controles negativos. Los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 exhibieron el mismo nivel del efecto antitumoral que el exhibido por los correspondientes anticuerpos sin ingeniería (anticuerpos humanizados N.º 0 a N.º 10) utilizados como anticuerpos comparativos fueron aproximadamente 1/13 a 1/20 concentraciones de las concentraciones de anticuerpos no diseñados por ingeniería genética, respectivamente. Para que las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 para alcanzar el mismo nivel del efecto antitumoral que el de los correspondientes anticuerpos no diseñados por ingeniería genética, las concentraciones fueron aproximadamente 1/150 de las concentraciones de anticuerpos no ingeridos, respectivamente. Estos resultados demostraron que los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo diseñado por ingeniería genética (los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 y los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10) exhiben una actividad antitumoral mejorada en comparación con los correspondientes anticuerpos no diseñado por ingeniería genética. Estos resultados también demostraron que las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo IV diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10 producen un efecto antitumoral más fuerte que el de los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo I diseñado por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo II diseñados por ingeniería genética N.º 0 a N.º 10, y las respectivas composiciones de anticuerpos que contienen los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de tipo III diseñados por ingeniería genética de N.º 0 a N.º 10.

Además, también se obtuvo un efecto antitumoral más fuerte similar para las células de cáncer de mama (MDA-MB-361), las células de cáncer colorrectal (HT-29), las células de cáncer de pulmón (QG56), las células de cáncer de estómago (NCI-N87), la células de cáncer uterino (HEC-1-A), las células de cáncer de próstata (22Rv1), las células de cáncer pancreático (Panc10.5), las células de cáncer de hígado (Hep3B), las células de cáncer de ovario (SKOV3), las células de cáncer de riñón (Caki-2), las células de tumor cerebral (U -87MG), las células cancerosas de la vejiga (T24 y HT-1376), las células cancerosas del esófago (OE33), las células leucémicas (OCI-AML5), las células del linfoma (Ramos), las células cancerosas de la vesícula biliar (TGBC14TKB), las células de fibrosarcoma (HT-1080), las células de melanoma (G-361), las células de cáncer de la corteza suprarrenal (A-673), las células tumorales de Ewing (RD-ES), las células de linfoma de Hodgkin (RPMI1666), las células de mesotelioma (NCI-H2452), las células de mieloma múltiple (IM-9), las células de cáncer de testículo (NT/D1), las células de cáncer de tiroides (TT) y las células de cáncer de cabeza y cuello (FaDu) utilizadas en la evaluación.

55 **Aplicabilidad industrial**

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

LISTADO DE SECUENCIAS

60 <110> Toray Industries, Inc.
<120> Composición farmacéutica para tratar y prevenir el cáncer
65 <130> PH-5938-PCT

<150> JP 2013-166164
 <151> 09/08/2013
 <160> 34
 5 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 5
 10 <212> PRT
 <213> Conejo
 <400> 1
 Ser His Ser Leu Gly
 15 1 5
 <210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Conejo
 <400> 2
 Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
 25 1 5 10 15
 <210> 3
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Conejo
 30 <400> 3
 Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu
 35 1 5 10
 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Conejo
 40 <400> 4
 Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn Glu Asn Leu Ala
 45 1 5 10
 <210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Conejo
 50 <400> 5
 Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 55 1 5
 <210> 6
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Conejo
 <400> 6

ES 2 704 909 T3

Leu Gly Glu Phe Ser Cys Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

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

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

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

Gly Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

ES 2 704 909 T3

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

<210> 9
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 9

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

ES 2 704 909 T3

Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

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

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

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

Gly Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys
50 55 60

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

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

Arg Thr Asn Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 11

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

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

ES 2 704 909 T3

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

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

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

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

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 12
<211> 113
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 12

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 13
<211> 113
<212> PRT

ES 2 704 909 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 13

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Leu
65 70 75 80

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

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

5 Lys

<210> 14

<211> 113

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 704 909 T3

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

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu

65 70 75 80

Gln Cys Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Leu Gly Glu Phe Ser Cys
85 90 95

Gly Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 15
<211> 112
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 15

5

ES 2 704 909 T3

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

Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn Glu
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
65 70 75 80

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

Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 16
<211> 5562
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 16

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg

60

ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca 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 cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	
ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa	615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu	
130 135 140	
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa	663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys	
145 150 155	
ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga	711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly	
160 165 170	
gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat	759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr	
175 180 185 190	
aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag	807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln	
195 200 205	
tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa	855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu	
210 215 220	
aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag	903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu	
225 230 235	

cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn 240 245 250	951
ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp 255 260 265 270	999
cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln 275 280 285	1047
agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu 290 295 300	1095
aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val 305 310 315	1143
gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala 320 325 330	1191
tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala 335 340 345 350	1239
gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met 355 360 365	1287
cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn 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	1671

ES 2 704 909 T3

480	485	490	
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 Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly 625 630 635			2103
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser 640 645 650			2151
cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr 655 660 665 670			2199
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala 675 680 685			2247
cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln 690 695 700			2295
atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca Met Asn Thr Gln Gln Val Asn 705			2349
aaaacacact ggccagtgtta ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttggttct			2409
cccttttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat			2469
tgtcagcgttt ctattacctg gatatggaag gaaactatgt ttactctgca tgttctgtcc			2529

taagcgatcat	cttgagcctt	gcacatgata	ctcagattcc	tcacccttgc	ttaggagtaa	2589
aacaatatac	tttacagggg	gataataatc	tccatagtta	tttgaagtgg	cttgaaaaag	2649
gcaagattga	cttttatgac	attggataaa	atctacaaat	cagccctcga	gttattcaat	2709
gataactgac	aaactaaatt	atttccttag	aaaggaagat	gaaaggagt	gagtgtggtt	2769
tggcagaaca	actgcatttc	acagcttttc	cagttaaatt	ggagcactga	acgttcagat	2829
gcataccaaa	ttatgcatgg	gtcctaatac	cacatataag	gctggctacc	agctttgaca	2889
cagcactggt	catctggcca	aacaactgtg	gttaaaaaaca	catgtaaaat	gctttttaac	2949
agctgatact	gtataagaca	aagccaagat	gcaaaattag	gctttgattg	gcactttttg	3009
aaaaatatgc	aacaaatatg	ggatgtaatc	cggatggccg	cttctgtact	taatgtgaaa	3069
tatttagata	cctttttgaa	cacttaacag	tttctttgag	acaatgactt	ttgtaaggat	3129
tgggtactatc	tatcattcct	tatgacatgt	acattgtctg	tcactaatcc	ttggattttg	3189
ctgtattgtc	acctaaattg	gtacaggtac	tgatgaaaat	ctctagtggg	taatcataac	3249
actctcggtc	acatgttttt	ccttcagctt	gaaagctttt	ttttaaaagg	aaaagatacc	3309
aaatgcctgc	tgctaccacc	cttttcaatt	gctatctttt	gaaaggcacc	agtatgtgtt	3369
ttagattgat	ttccctgttt	cagggaaatc	acggacagta	gtttcagttc	tgatgggtata	3429
agcaaaacaa	ataaaacgtt	tataaaagtt	gtatcttgaa	acactgggtg	tcaacagcta	3489
gcagcttatg	tgattcaccc	catgccacgt	tagtgtcaca	aatttttatgg	tttatctcca	3549
gcaacatttc	tctagtactt	gcacttatta	tcttttgtct	aatttaacct	taactgaatt	3609
ctccgtttct	cctggaggca	tttatattca	gtgataattc	cttcccttag	atgcataggg	3669
agagtctcta	aatttgatgg	aatggacac	ttgagttagt	acttagcctt	atgtactctg	3729
ttggaatttg	tgctagcagt	ttgagcacta	gttctgtgtg	cctaggaagt	taatgctgct	3789
tattgtctca	ttctgacttc	atggagaatt	aatccacct	ttaagcaaag	gctactaagt	3849
taatgggtatt	ttctgtgcag	aaattaaatt	ttattttcag	catttagccc	aggaattcct	3909
ccagtaggtg	ctcagctatt	taaaaacaaa	actattctca	aacattcatc	attagacaac	3969
tggagttttt	gctgggtttg	taacctacca	aatggatag	gctgttgaac	attccacatt	4029
caaaagtttt	gtaggggtgg	gggaaatggg	ggatcttcaa	tgtttatttt	aaaataaaat	4089
aaaataagtt	cttgactttt	ctcatgtgtg	gttgtgtgtac	atcatattgg	aagggttaac	4149
ctgttacttt	ggcaaatgag	tatttttttg	ctagcacctc	cccttgcggtg	ctttaaatga	4209
catctgcctg	ggatgtacca	caaccatatg	ttacctgtat	cttaggggaa	tggataaaat	4269
atttgtgggt	tactgggttaa	tccctagatg	atgtatgctt	gcagtcctat	ataaaactaa	4329
atttgtctatc	tgtgtagaaa	ataatttcat	gacatttaca	atcaggactg	aagtaagttc	4389

```

ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449
gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaaggtgt 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
ccttttgttt ggtcaaatgc atatttttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809
tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869
taaatcatct catgtggata tgaaacttct tttttaaaac ttaaaaaggt agaatgttat 4929
tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989
aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049
atcagtttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109
tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttatttctca gaaggttcat taactgaggt 5169
gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttcctaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229
atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289
tcattttatg tttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg 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

```

<210> 17
 <211> 709
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

```

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

```

ES 2 704 909 T3

Leu	Arg	Asn	Leu	Glu	Lys	Lys	Lys	Gly	Lys	Leu	Asp	Asp	Tyr	Gln	Glu	
65					70					75					80	
Arg	Met	Asn	Lys	Gly	Glu	Arg	Leu	Asn	Gln	Asp	Gln	Leu	Asp	Ala	Val	
				85					90					95		
Ser	Lys	Tyr	Gln	Glu	Val	Thr	Asn	Asn	Leu	Glu	Phe	Ala	Lys	Glu	Leu	
			100					105					110			
Gln	Arg	Ser	Phe	Met	Ala	Leu	Ser	Gln	Asp	Ile	Gln	Lys	Thr	Ile	Lys	
		115					120					125				
Lys	Thr	Ala	Arg	Arg	Glu	Gln	Leu	Met	Arg	Glu	Glu	Ala	Glu	Gln	Lys	
	130					135						140				
Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Leu	Asp	Lys	Leu	Gly	
145					150					155					160	
Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Gln	Gly	Leu	Asn	Gly	Val	Pro	
				165					170					175		
Ile	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu	
			180					185					190			
Val	Asp	Pro	Glu	Arg	Asp	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Gln	Tyr	Glu	
		195					200					205				
His	Ala	Ser	Ile	His	Leu	Trp	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Glu	Lys	Pro	
	210					215					220					
Val	Cys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Val	
225					230					235					240	
Phe	Gln	Ser	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser	Thr	His	Asn	His	Gln	Asn	Gly	Leu	
				245					250					255		
Cys	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Asp	Gln	Val	
			260					265					270			
Pro	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Glu	Gln	Ser	Glu	
		275					280					285				
Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Val	Asn	Arg	Gln	Phe	Met	Ala	Glu	Thr	Gln	
	290					295					300					
Phe	Thr	Ser	Gly	Glu	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Glu	Trp	Thr	Val	Glu	Thr	
305					310					315					320	

ES 2 704 909 T3

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				

ES 2 704 909 T3

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> 18
<211> 3553
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

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

<400> 18

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg 60

ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc 120

ggaaggggacc 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

ES 2 704 909 T3

gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr 35 40 45	327
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp 50 55 60	375
aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr 65 70 75	423
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp 80 85 90	471
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys 95 100 105 110	519
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	1047

ES 2 704 909 T3

275										280										285										
agt	gaa	gtt	gaa	tca	aca	gag	tat	gta	aat	aga	cag	ttc	atg	gca	gaa															1095
Ser	Glu	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Val	Asn	Arg	Gln	Phe	Met	Ala	Glu															
			290					295					300																	
aca	cag	ttc	acc	agt	ggg	gaa	aag	gag	cag	gta	gat	gag	tgg	aca	gtt															1143
Thr	Gln	Phe	Thr	Ser	Gly	Glu	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Glu	Trp	Thr	Val															
		305					310					315																		
gaa	acg	gtt	gag	gtg	gta	aat	tca	ctc	cag	cag	caa	cct	cag	gct	gca															1191
Glu	Thr	Val	Glu	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Ala	Ala															
		320				325					330																			
tcc	cct	tca	gta	cca	gag	ccc	cac	tct	ttg	act	cca	gtg	gct	cag	gca															1239
Ser	Pro	Ser	Val	Pro	Glu	Pro	His	Ser	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Ala															
335					340					345					350															
gat	ccc	ctt	gtg	aga	aga	cag	cga	gta	caa	gac	ctt	atg	gca	caa	atg															1287
Asp	Pro	Leu	Val	Arg	Arg	Gln	Arg	Val	Gln	Asp	Leu	Met	Ala	Gln	Met															
				355				360					365																	
cag	ggg	ccc	tat	aat	ttc	ata	cag	gat	tca	atg	ctg	gat	ttt	gaa	aat															1335
Gln	Gly	Pro	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gln	Asp	Ser	Met	Leu	Asp	Phe	Glu	Asn															
			370				375						380																	
cag	aca	ctt	gat	cct	gcc	att	gta	tct	gca	cag	cct	atg	aat	cca	aca															1383
Gln	Thr	Leu	Asp	Pro	Ala	Ile	Val	Ser	Ala	Gln	Pro	Met	Asn	Pro	Thr															
		385				390						395																		
caa	aac	atg	gac	atg	ccc	cag	ctg	gtt	tgc	cct	cca	gtt	cat	tct	gaa															1431
Gln	Asn	Met	Asp	Met	Pro	Gln	Leu	Val	Cys	Pro	Pro	Val	His	Ser	Glu															
		400				405					410																			
tct	aga	ctt	gct	cag	cct	aat	caa	gtt	cct	gta	caa	cca	gaa	gcg	aca															1479
Ser	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro	Asn	Gln	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr															
415					420					425				430																
cag	gtt	cct	ttg	gta	tca	tcc	aca	agt	gag	ggg	tac	aca	gca	tct	caa															1527
Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ser	Gln															
				435					440				445																	
ccc	ttg	tac	cag	cct	tct	cat	gct	aca	gag	caa	cga	cca	cag	aag	gaa															1575
Pro	Leu	Tyr	Gln	Pro	Ser	His	Ala	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu															
			450				455						460																	
cca	att	gat	cag	att	cag	gca	aca	atc	tct	tta	aat	aca	gac	cag	act															1623
Pro	Ile	Asp	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Thr															
		465				470						475																		
aca	gca	tca	tca	tcc	ctt	cct	gct	gcg	tct	cag	cct	caa	gta	ttt	cag															1671
Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Val	Phe	Gln															
		480				485					490																			
gct	ggg	aca	agc	aaa	cct	tta	cat	agc	agt	gga	atc	aat	gta	aat	gca															1719
Ala	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Asn	Ala															
495					500					505				510																
gct	cca	ttc	caa	tcc	atg	caa	acg	gtg	ttc	aat	atg	aat	gcc	cca	gtt															1767
Ala	Pro	Phe	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Pro	Val															
				515					520				525																	
cct	cct	gtt	aat	gaa	cca	gaa	act	tta	aaa	cag	caa	aat	cag	tac	cag															1815

ES 2 704 909 T3

Pro	Pro	Val	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gln	
			530					535						540		
gcc	agt	tat	aac	cag	agc	ttt	tct	agt	cag	cct	cac	caa	gta	gaa	caa	1863
Ala	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	His	Gln	Val	Glu	Gln	
		545					550					555				
aca	gag	ctt	cag	caa	gaa	cag	ctt	caa	aca	gtg	gtt	ggc	act	tac	cat	1911
Thr	Glu	Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His	
	560					565					570					
ggc	tcc	cca	gac	cag	tcc	cat	caa	gtg	act	ggc	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	ggc	gtg	tct	cgt	gga	ggc	tcc	cgt	ggc	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	ggc	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	ggc	tat	aca	cag	tct	2151
Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ser	
	640					645					650					
cag	ttc	agt	gct	ccc	cgg	gat	tac	tct	ggc	tat	caa	cgg	gat	gga	tat	2199
Gln	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Arg	Asp	Gly	Tyr	
655					660					665					670	
cag	cag	aat	ttc	aag	cga	ggc	tct	ggg	cag	agt	gga	cca	cgg	gga	gcc	2247
Gln	Gln	Asn	Phe	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Gln	Ser	Gly	Pro	Arg	Gly	Ala	
			675					680						685		
cca	cga	ggc	aat	att	ttg	tgg	tgg	tga	tcctagctcc	taagtggagc						2294
Pro	Arg	Gly	Asn	Ile	Leu	Trp	Trp									
			690													
ttctgttctg	gccttggaag	agctgttaat	agtctgcatg	tttaggaatac	atttatcctt											2354
tccagacttg	ttgctaggga	ttaaatgaaa	tgctctgttt	ctaaaactta	atcttgacc											2414
caaattttta	tttttgaatg	atttaatttt	ccctgttact	atataaactg	tcttgaaaac											2474
tagaacatat	tctcttctca	gaaaaagtgt	ttttccaact	gaaaattatt	tttcaggtcc											2534
taaaacctgc	taaatgtttt	taggaagtac	ttactgaaac	atttttgtaa	gacatttttg											2594
gaatgagatt	gaacatttat	ataaatttat	tattcctctt	tcattttttt	gaaacatgcc											2654
tatttatatt	tagggccaga	caccctttta	tgcccgata	agccatagtt	aacatttaga											2714
gaaccattta	gaagtgatag	aactaatgga	atttgcaatg	ccttttggaac	ctctattagt											2774
gatataaata	tcaagttatt	tctgactttt	aaacaaaact	cccaaattcc	taacttattg											2834
agctatactt	aaaaaaaatt	acaggttttag	agagtttttt	gtttttcttt	tactgttgga											2894

ES 2 704 909 T3

aaactacttc ccatttttggc aggaagttaa cctattttaac aattagagct agcattttcat	2954
gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgagggagg ttaaacaatca aacagggttc	3014
ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgtaaggag gaattacaac gtactttgat	3074
ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaaaaat taatggatca	3134
cttgggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta	3194
tggtctttcc cacctttag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc	3254
tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat	3314
gttatgtagt ttctttttta cagtttaggt aataaggtct gttttcattc tgggtgctttt	3374
attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga	3434
atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgctgtatct attcccaacg	3494
cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa tatttggtga atgaatgaa	3553

<210> 19
 <211> 694
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 19

ES 2 704 909 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

ES 2 704 909 T3

130					135					140					
Arg	Leu	Lys	Thr	Val	Leu	Glu	Leu	Gln	Tyr	Val	Leu	Asp	Lys	Leu	Gly
145					150					155					160
Asp	Asp	Glu	Val	Arg	Thr	Asp	Leu	Lys	Gln	Gly	Leu	Asn	Gly	Val	Pro
				165					170					175	
Ile	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ser	Leu	Leu	Asp	Glu	Phe	Tyr	Lys	Leu
			180					185					190		
Val	Asp	Pro	Glu	Arg	Asp	Met	Ser	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Gln	Tyr	Glu
		195					200					205			
His	Ala	Ser	Ile	His	Leu	Trp	Asp	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Glu	Lys	Pro
	210					215					220				
Val	Cys	Gly	Thr	Thr	Tyr	Lys	Val	Leu	Lys	Glu	Ile	Val	Glu	Arg	Val
225						230					235				240
Phe	Gln	Ser	Asn	Tyr	Phe	Asp	Ser	Thr	His	Asn	His	Gln	Asn	Gly	Leu
				245					250					255	
Cys	Glu	Glu	Glu	Glu	Ala	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Glu	Asp	Gln	Val
			260					265					270		
Pro	Glu	Ala	Glu	Pro	Glu	Pro	Ala	Glu	Glu	Tyr	Thr	Glu	Gln	Ser	Glu
		275					280					285			
Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Tyr	Val	Asn	Arg	Gln	Phe	Met	Ala	Glu	Thr	Gln
	290					295					300				
Phe	Thr	Ser	Gly	Glu	Lys	Glu	Gln	Val	Asp	Glu	Trp	Thr	Val	Glu	Thr
305						310					315				320
Val	Glu	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Gln	Gln	Gln	Pro	Gln	Ala	Ala	Ser	Pro
				325					330					335	
Ser	Val	Pro	Glu	Pro	His	Ser	Leu	Thr	Pro	Val	Ala	Gln	Ala	Asp	Pro
			340					345					350		
Leu	Val	Arg	Arg	Gln	Arg	Val	Gln	Asp	Leu	Met	Ala	Gln	Met	Gln	Gly
		355					360					365			
Pro	Tyr	Asn	Phe	Ile	Gln	Asp	Ser	Met	Leu	Asp	Phe	Glu	Asn	Gln	Thr
	370					375					380				

ES 2 704 909 T3

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	

ES 2 704 909 T3

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> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> Conejo

5

<400> 20

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

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

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

Asp Ile Arg Ser Gly Gly Ser Ala Tyr Tyr Ala Asn Trp Ala Lys Gly
50 55 60

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

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

Gly Pro Ser Asp Leu Thr Asn Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Conejo

15

<400> 21

ES 2 704 909 T3

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

Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Leu Tyr Asn Asn Glu
20 25 30

Asn Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Arg Leu
35 40 45

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

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

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

Ser Ala Asp Cys Phe Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 22
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

gaggtgcagc tcgtcgagag cggcggaggc ctcgtccaac ctggaggcag cctgagactg 60
agttgcgccg cttccggctt cagcctgtcc agccactccc tcggctgggt gaggcaggcc 120
cctggcaagg gactggagtg gatcggcgat atccgcagcg gaggctccgc ttactatgcc 180
aactgggcta aggaagggtt caccatttcc cgggacaact ctaagaatac actgtatttg 240
caaatgaata gcttgcgcgc cgaggataca gccgtgtact tctgtaccgc gacaaacgga 300
cccagcgacc tgaccaatag gctcgacctc tggggacagg gcacattggt gacagtgtcc 360
tca 363

<210> 23
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 704 909 T3

		gaggtgcagc tcgtcgagag cggcggaggc ctcgccaac ctggaggcag cctgagactg	60
		agttgcgccg cttccggctt cagcctgtcc agccactccc tcggctgggt gaggcaggcc	120
		cctggcaagg gactggagtg gatcggcgat atccgcagcg gaggtccgc ttactatgcc	180
		aactgggcta aggggaaggtt caccatttcc cgggacaaca gcaagaatac cctgtatttg	240
		caaatgaata gcttgcgcgc cgaggatata gccgtgtact actgtaccgc gacaaacgga	300
		cccagcgacc tgaccaatag gctcgacctc tggggacagg gcacattggg gacagtgtcc	360
		tca	363
5		<210> 24 <211> 360 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 24	
		cagagcctgg tcgagagcgg cggaggcctc gtgcaaccgc gaggcagcct gcggctgagc	60
		tgcgctgcca gcggcttttc cctctccagc cacagcctgg gatgggtcag gcaagcccct	120
		ggcaaaggcc tcgagtggat tggcgatata cggtcgggag gcagcgcta ttacgctaac	180
		tgggctaagg gaaggtttac catttcccg accagctcca aaaacacagt gtatctgcaa	240
		atgaattccc tgcgggccga agacacagcc gtctactttt gcacaaggac aaacggaccc	300
10		agcgacctca ccaataggct cgacctctgg ggacagggaa ccctcgtgac agtgtccagc	360
15		<210> 25 <211> 363 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 25	
		gaacagagcc tggtcgagag cggcggaggc ctcggtgaac ccggaggcag cctgcggctg	60
		agctgcgctg ccagcggctt ttccctctcc agccacagcc tgggatgggt caggcaagcc	120
		cctggcaaag gcctcgagtg gattggcgat atccggtcgc gaggcagcgc ctattacgct	180
		aactgggcta aggggaaggtt taccatttcc cgggataact ccaaaaacac actgtatctg	240
		caaatgaatt ccctgcgggc cgaagacaca gccgtctact attgcacaag gacaaacgga	300
		cccagcgacc tcaccaatag gctcgacctc tggggacagg gaaccctcgt gacagtgtcc	360
20		agc	363
25		<210> 26 <211> 339 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
		<400> 26	

ES 2 704 909 T3

gccatccaaa tgacacagag ccccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc 60
atcaattgcc aggtttccca gtccctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag 120
aaacccggca aggtgcccaa gaggtctcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg 180
tcctcccggg tctccggcag cggctctggc accgaattca cattgaccat tagcaacctg 240
cagcctgagg acttcgctac atactactgt ctgggagagt tttcctgcgg cagcgccgat 300

tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa 339

<210> 27
<211> 339
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 27

gagatcgtcc tgacacagag ccccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc 60
atcaattgcc aggtttccca gtccctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag 120
aaacccggca aggtgcccaa gaggtctcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg 180
tcctcccggg tctccggcag cggctctggc accgaattca cattgaccat tagcaacctg 240
cagcctgagg acttcgctac atactactgt ctgggagagt tttcctgcgg cagcgccgat 300

tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa 339

<210> 28
<211> 339
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 28

gagcaggtcc tgacacagag ccccagctcc ctctccgcca gcgtgggaga ccgggtgacc 60
atcaattgcc aggtttccca gtccctctac aataacgaaa acctcgctg gttccaacag 120
aaacccggca aggtgcccaa gaggtctcatc tacggagcca gcaccctggc ctccggagtg 180
tcctcccggg tctccggcag cggctctggc accgaattca cattgaccat tagcaacctg 240
cagcctgagg acttcgctat ctactactgt ctgggagagt tttcctgcgg cagcgccgat 300

tgcttcgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagatcaaa 339

<210> 29
<211> 339
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 29

ES 2 704 909 T3

	gacattgtgc tcaccaatc cccttcagc ctgagcgcca gcgtgggaga ccgggtgaca	60
	atcaattgcc aagccagcca gagcctgtat aacaatgaga atctggcttg gtttcagcaa	120
	aagcctggca aagtgcctaa gcggctgatt tacggagcca gcaccctcgc cagcggcgtc	180
	tccagcaggt tttccgcatc cggatccgga accgaattca cactgacaat cagctccctc	240
	cagtgtgagg atttcgctat ctattactgt ctgggagagt tttcctgtgg cagcgccgat	300
	tgctttgcct ttggcggagg cacaaaggtc gagattaag	339
5	<210> 30 <211> 336 <212> ADN <213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 30	
	caagtgtca cccaatccc ttccagcctg agcgccagcg tgggagaccg ggtgacaatc	60
	aattgccaag ccagccagag cctgtataac aatgagaatc tggtttggtt tcagcaaaag	120
	cctggcaaaag tgcctaagcg gctgatttac ggagccagca ccctcgccag cggcgctctc	180
	agcagggtttt ccggatccgg atccggaacc gaattcacac tgacaatcag ctccctccag	240
	tgtgaggatt tcgctatcta ttactgtctg ggagagtttt cctgtggcag cgcgattgc	300
10	tttgcctttg gcggaggcac aaaggctcag attaag	336
15	<210> 31 <211> 354 <212> ADN <213> Conejo	
	<400> 31	
	cagtcgctgg aggagtccgg gggtcgcctg gtcacgcctg ggacaccct gacactcacc	60
	tgcacagcct ctggattctc cctcagtagc cattcattgg gctgggtccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatggat cggagacatt aggagtgggtg gtagcgcata ctacgcgaac	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtggctct gaagatgacc	240
	agtctgacaa ccgaggacac ggccacctat ttctgtacca gaactaatgg tcccagtgat	300
20	ctgactaata ggttggatct ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctca	354
25	<210> 32 <211> 336 <212> ADN <213> Conejo	
	<400> 32	

ES 2 704 909 T3

caagtactga	cccagactcc	atcctccgtg	tctgcagctg	tgggaggcac	agtcaccatc	60
aactgccagg	ccagtcagag	tctttataat	aacgaaaatt	tagcctgggt	tcagcagaaa	120
ccagggcagc	ctcccaagcg	cctgatctat	ggtgcatcca	ctctggcatc	tggggctctca	180
tcgcggttca	aaggcagtgg	atctgggaca	cagttcactc	tcaccatcgg	cgacgtgcag	240
tgtgacgatg	ctgccattta	ctattgtcta	ggcgaattta	gttgtggtag	tgctgattgt	300
tttgctttcg	gcgaggggac	cgaggtgggtc	gtcaaa			336

<210> 33
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 33

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

ES 2 704 909 T3

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	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	115	120	125	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	130	135	140	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	145	150	155	160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	165	170	175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	180	185	190	
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	195	200	205	
Lys	Ala	Leu	Pro	Leu	Pro	Glu	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	Asp	Glu	225	230	235	240
Leu	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				

ES 2 704 909 T3

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> 34
<211> 330
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

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 Asp 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

ES 2 704 909 T3

145					150						155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Glu	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	Asp	Glu	
225					230					235					240	
Leu	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							

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo que comprende
una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ
5 ID NO: 1, 2 y 3 y
una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de la complementariedad de las SEQ ID
NO: 4, 5 y 6, y
tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRINA-1, o un fragmento de la misma.
- 10 2. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1,
en los que:
 - (i) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15; o
 - 15 (ii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15; o
 - (iii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15; o
 - 20 (iv) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13; o
 - (v) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12;
 - 25 (vi) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:12; o
 - (vii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:13; o
 - 30 (viii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:10, y la
región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:14; o
 - (ix) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:8, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11; o
 - (x) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:7, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:11; o
 - 35 (xi) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:9, y la región
variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:15; o
 - (xii) la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:20, y la
región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:21.
- 40 3. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un
anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
4. 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.
5. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo comprende la
45 sustitución de uno o más aminoácidos en la región constante de la cadena pesada del mismo.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo
que carece de fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el extremo reductor de la cadena de azúcar de una cadena
de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante de la cadena pesada.
- 50 7. Una composición de anticuerpo que comprende un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 y un anticuerpo
de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que tiene fucosa añadida a N-acetilglucosamina en el
extremo reductor de una cadena de azúcar de una cadena de azúcar unida a N-glucósido unida a la región constante
de la cadena pesada.
- 55 8. Una célula que produce un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6 o una composición de anticuerpo de
acuerdo con la reivindicación 7.
9. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo o un fragmento del mismo según una cualquiera de
60 las reivindicaciones 1 a 4, un anticuerpo según las reivindicaciones 5 o 6, o una composición de anticuerpo según la
reivindicación 7 como principio activo.
10. Un producto farmacéutico de combinación que comprende una composición farmacéutica según la reivindicación
9 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
- 65 11. Un ADN que codifica un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las

reivindicaciones 1 a 5.

5 12. El anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 6, una composición de anticuerpo según la reivindicación 7, una composición farmacéutica según la reivindicación 9, o una combinación de producto farmacéutico según la reivindicación 10, para su uso en un procedimiento de tratamiento y/o prevención del cáncer.

10 13. El anticuerpo, el fragmento, la composición de anticuerpo, la composición farmacéutica o el producto farmacéuticos de combinación para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer de estómago, cáncer de útero, cáncer de ovarios, cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, sarcoma, mastocitoma, melanoma, cáncer de la corteza suprarrenal, tumor de Ewing, linfoma de Hodgkin, mesotelioma, mieloma múltiple, cáncer de testículo, cáncer de tiroides o cáncer de cabeza y cuello.