

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 739 380**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/30** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

**C12N 15/09** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/JP2013/054345**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13125640**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13751164 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019 EP 2824114**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento del cáncer**

30 Prioridad:

**21.02.2012 JP 2012035491**

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

**30.01.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 739 380 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 del cáncer

5 **Campo técnico**

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

10 **Técnica antecedente**

El cáncer es la principal causa de muerte. En la actualidad, esta enfermedad se trata principalmente mediante terapia quirúrgica en combinación con radioterapia y/o quimioterapia. A pesar del reciente desarrollo de novedosas técnicas quirúrgicas o del descubrimiento de novedosos agentes contra el cáncer, el tratamiento actual del cáncer tiene un resultado escasamente mejorado, excepto para algunos tipos de cáncer. Con los últimos avances en biología molecular o en inmunología del cáncer, se han identificado anticuerpos que reaccionan específicamente con cáncer, antígenos tumorales que son reconocidos por linfocitos T citotóxicos, genes que codifican dichos antígenos tumorales y similares, lo que genera expectativas sobre la carcinoterapia específica que se dirige a antígenos tumorales (bibliografía no de patente 1).

Para reducir las reacciones adversas de la carcinoterapia, se desea que los péptidos, los polipéptidos o las proteínas reconocidos como antígenos tumorales, rara vez deben existir en células normales y existir específicamente en células cancerosas. En 1991, Boon et al. (Ludwig Institute for Cancer Research, Bélgica) aislaron un antígeno MAGE1 de melanoma humano reconocido por linfocitos T CD8 positivos mediante un método de clonación de expresión de ADNc utilizando líneas celulares de cáncer autólogas y linfocitos T reactivos contra el cáncer (bibliografía no de patente 2). Después, se ha comunicado un método SREX (siglas del inglés *serological identification of antigens by recombinant expression cloning*, identificación serológica de antígenos expresados por clonación recombinante), que adopta una estrategia de clonación de expresión génica para identificar antígenos tumorales reconocidos por anticuerpos producidos *in vivo* en respuesta a un cáncer autólogo en un paciente con cáncer (bibliografía no de patente 3 y bibliografía de patente 1). Según este método, se han aislado algunos antígenos tumorales que rara vez se expresan en células normales y que se expresan específicamente en cáncer (bibliografía no de patente 4 a 9). Asimismo, la terapia celular que utiliza inmunocitos que reaccionan específicamente con antígenos tumorales o la inmunoterapia específica contra el cáncer que utiliza vacunas o similares que comprenden antígenos tumorales, se encuentra en un ensayo clínico dirigido a algunos de los antígenos tumorales aislados.

En los últimos años, en el mundo han surgido varios fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer dirigidos a proteínas antigénicas en células cancerosas. Estos fármacos han recibido atención debido a su cierta eficacia como agentes terapéuticos específicos para el cáncer. Sin embargo, una inmensa mayoría de proteínas antigénicas que son específicas de fármacos, también se expresan en células normales. Como resultado de la administración de anticuerpos, las células cancerosas, así como las células normales que expresan los antígenos, resultan dañadas, lo que por desgracia produce reacciones adversas. Por lo tanto, si pueden identificarse antígenos del cáncer expresados específicamente en la superficie de las células cancerosas y como fármacos pueden utilizarse anticuerpos dirigidos a antígenos, cabe esperar que estos fármacos de anticuerpos logren un tratamiento con reacciones menos adversas.

La proteína 1 citoplasmática y asociada a proliferación (CAPRIN-1) se conoce como una proteína intracelular que se expresa después de la activación o división celular de 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 en 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 una diana de fármacos de anticuerpos para el tratamiento del cáncer (bibliografía de patente 2).

**Lista de citas**

Bibliografía de patente

Bibliografía de patente 1: Patente estadounidense N.º 5698396

Bibliografía de patente 2: documento WO2010 / 016526

Bibliografía no de patente

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

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

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

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

Bibliografía no de patente 5: Cancer Res., 58: 1034-1041 (1998)  
 Bibliografía no de patente 6: Int. J. Cancer, 29: 652-65.8 (1998)  
 Bibliografía no de patente 7: Int. J. Oncol., 14: 703-708 (1999)  
 Bibliografía no de patente 8: Cancer Res., 56: 4766-4772 (1996)  
 Bibliografía no de patente 9: Hum. Mol. Genet 6: 33-39, 1997

## Sumario de la invención

### Problema técnico

Un objetivo de la presente invención es producir un anticuerpo dirigido contra CAPRIN-1 que se exprese específicamente en la superficie de células cancerosas y que sea superior en cuanto a actividad antitumoral que los anticuerpos convencionales, y proporcionar su uso como un agente terapéutico para el cáncer.

### Solución del problema

Los aspectos de la presente invención son los siguientes:

La presente invención proporciona un anticuerpo, o un fragmento del mismo, como se define en las reivindicaciones, que se une a un polipéptido parcial de CAPRIN-1 que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5

En las reivindicaciones se definen aspectos y realizaciones adicionales de la invención, incluyendo medios para su uso en el tratamiento del cáncer.

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

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

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

### Efectos ventajosos de la invención

El anticuerpo contra CAPRIN-1 según la presente invención, produce daños a las células cancerosas. Por lo tanto, el anticuerpo contra CAPRIN-1 es útil en el tratamiento o en la prevención de cáncer.

### Descripción de realizaciones

El anticuerpo según la presente invención es un anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido parcial predeterminado de CAPRIN-1 y que tiene actividad antitumoral. De manera más específica, el anticuerpo según la presente invención, es un anticuerpo que se une a un polipéptido parcial de una proteína CAPRIN-1 (polipéptido parcial de CAPRIN-1) que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5.

En la presente divulgación, se ha demostrado que este anticuerpo presenta actividad antitumoral. Por lo tanto, la presente invención se refiere además a todos los anticuerpos que se unen a fragmentos de proteínas CAPRIN-1 como se define en las reivindicaciones y que presentan actividad antitumoral.

El anticuerpo contra CAPRIN-1 según la presente invención, puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda 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')<sub>2</sub> y Fv). Estos anticuerpos y sus fragmentos pueden prepararse mediante métodos generalmente conocidos por los expertos en la materia. Preferentemente, el anticuerpo según la presente invención se une específicamente a la proteína CAPRIN-1, o a su polipéptido parcial, como se define en las reivindicaciones, mediante una reacción de anticuerpo contra antígeno. En este contexto, la frase "que se une específicamente a la proteína CAPRIN-1" significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRIN-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas. El anticuerpo según la presente invención es preferentemente un anticuerpo monoclonal y, sin embargo, puede ser un anticuerpo policlonal siempre que puedan producirse anticuerpos homogéneos de manera estable. Cuando el sujeto es un ser humano, para impedir o suprimir un rechazo, es deseable un anticuerpo humano o humanizado.

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

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

5 En lo sucesivo, la presente invención se describirá con más detalle.

<Preparación de antígenos para la preparación de anticuerpos>.

10 Las proteínas, o sus fragmentos, utilizados como antígenos sensibilizantes para obtener el anticuerpo contra CAPRIN-1 según la presente invención, no se limitan a ninguna especie animal que sirva de origen, incluyendo seres humanos, perros, gatos, ganado, caballos, ratones, ratas y pollos. Sin embargo, para su uso en fusión celular, las proteínas, o sus fragmentos, se seleccionan preferentemente a tenor de su compatibilidad con células progenitoras. En general, se prefieren proteínas derivadas de mamíferos. En particular, se prefieren proteínas derivadas de seres humanos. Por ejemplo, cuando CAPRIN-1 es CAPRIN-1 humana, pueden utilizarse proteínas CAPRIN-1 humanas, péptidos  
15 parciales de las mismas, o células que expresan CAPRIN-1 humana.

Pueden obtenerse secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y de sus homólogos, por ejemplo, accediendo al GenBank (NCBI, Estados Unidos) y utilizando un algoritmo, tal como BLAST o FASTA (Karlin y Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90: 5873-5877, 1993; y Altschul y col., Nucleic Acids Res. 25: 3389-  
20 3402, 1997).

En la presente divulgación, con referencia a la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1 o 3) o a la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 2 o 4) de la proteína CAPRIN-1 humana, la CAPRIN-1 diana es un ácido nucleico o una  
25 proteína que consta de una secuencia que tiene del 70 % al 100 %, preferentemente del 80% al 100%, más preferentemente del 90 % al 100 %, aún más preferentemente del 95 % al 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 de aminoácidos del ORF (del inglés *open reading frame* marco abierto de lectura) de la parte madura de la referencia (cabe destacar que las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 4 comparadas entre sí difieren en los restos de aminoácidos en la posición 690 y después de esta). En este contexto, la expresión "% de identidad de  
30 secuencia" significa un porcentaje (%) del número de aminoácidos (o bases) idénticos con respecto al número total (incluido el número de huecos) de aminoácidos (o bases) cuando se alinean dos secuencias de tal manera que pueda obtenerse el máximo grado de similitud o identidad con o sin huecos introducidos.

Un fragmento que comprende un epítipo (o un determinante antigénico), que es la unidad más pequeña reconocida por el anticuerpo, y que tiene una longitud que varía de la longitud de aminoácidos del epítipo a menos de la longitud completa de la proteína CAPRIN-1, puede utilizarse como un fragmento de proteína CAPRIN-1. El epítipo se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente, en seres humanos. Su unidad más pequeña consta de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos. El fragmento de proteína CAPRIN-1, para su uso en la preparación del anticuerpo según la presente  
35 invención, es preferentemente un fragmento que reconoce el anticuerpo de la presente invención y que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 (que corresponde a una secuencia de las posiciones 513 a 528 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4) o una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 % o más, aún más preferentemente 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o que comprende al menos un epítipo que consta de  
40 aproximadamente 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos en cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

Las proteínas CAPRIN-1 humanas y los fragmentos polipeptídicos anteriores que comprenden péptidos parciales de los mismos, pueden sintetizarse según métodos de síntesis química, por ejemplo, métodos Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) y tBoc (t-butiloxycarbonilo) (Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experimentation Course in English) 1, the Japanese Biochemical Society ed., Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Tokyo Kagaku Dojin Co., Ltd. (Japón), 1981). Además, estos polipéptidos pueden sintetizarse por métodos habituales utilizando varios sintetizadores de péptidos disponibles en el comercio.

55 Como alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse utilizando estrategias de modificación por ingeniería genética conocidas en la materia (Sambrook et al., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) e incorporarse en vectores de expresión, que después se introducen en células hospedadoras de tal manera que las células hospedadoras produzcan los polipéptidos. De esta manera, pueden obtenerse las proteínas CAPRIN-1 humana de interés o sus fragmentos polipeptídicos.

60 Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos pueden prepararse fácilmente mediante estrategias de modificación por ingeniería genética conocidas en la materia o mediante métodos habituales utilizando sintetizadores de ácidos nucleicos disponibles en el comercio. Por ejemplo, puede prepararse un ADN que comprenda la secuencia de nucleótidos de un gen de CAPRIN-1 mediante PCR utilizando, como molde, un ADN cromosómico humano o una

biblioteca de ADNc 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 apropiadamente. Como ejemplos de condiciones pueden incluirse, pero sin limitación, 30 ciclos que implican, cada uno de ellos, etapas de 94 °C durante 30 segundos (desnaturalización), 55 °C durante de 30 segundos a 1 minuto (hibridación) y 72 °C durante 2 minutos (elongación) utilizando ADN polimerasa termoestable (por ejemplo, Taq polimerasa (polimerasa de *Thermus aquaticus*) o Pfu polimerasa (polimerasa de *Pyrococcus furiosus*)) y un tampón de PCR que contiene Mg<sup>2+</sup>, seguido de reacción a 72 °C durante 7 minutos. La estrategia de PCR, sus condiciones, etc. se describen, por ejemplo, en Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, 3ª edición, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (particularmente, capítulo 15).

Además, pueden prepararse sondas o cebadores apropiados basándose en información acerca de las secuencias de nucleótidos de genes CAPRIN-1 y en las secuencias de aminoácidos de proteínas CAPRIN-1 y utilizarse, por ejemplo, en el cribado de una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, dicha biblioteca de ADNc se produce a partir de células, órganos o tejidos que expresan proteínas CAPRIN-1. Como ejemplos de dichas células o tejidos se incluyen células o tejidos procedentes del testículo o de cánceres o tumores, tales como cáncer de testículo, leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de páncreas y cáncer de intestino grueso. Estas operaciones, que incluyen la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, el cribado de la biblioteca de ADNc y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la materia y pueden realizarse según métodos descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), y en Ausubel y col., (*ibid.*) citado anteriormente). Los ADN que codifican las proteínas CAPRIN-1 humanas y sus péptidos parciales pueden obtenerse a partir del ADN obtenido de este modo.

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

En el caso de utilizar células procariotas como células hospedadoras, los vectores de expresión utilizados 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. Como ejemplos de vectores de expresión para *E. coli* pueden incluirse la serie pUC, pBluescript II, sistemas de expresión pET y sistemas de expresión pGEX. Los ADN que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que posteriormente se transforman las células hospedadoras procariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células hospedadoras procariotas. A este respecto, los polipéptidos pueden expresarse como proteínas de fusión con otras proteínas.

En caso de utilizar células eucariotas como células hospedadoras, como vectores de expresión se utilizan vectores de expresión para células eucariotas que tienen un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición de poli(A), etc. Como ejemplos de dichos vectores de expresión pueden incluirse los vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 y pYES2. De la misma manera que antes, los ADN que codifican los polipéptidos anteriores pueden incorporarse en dichos vectores de expresión, con los que posteriormente se transforman las células hospedadoras eucariotas, seguido del cultivo de los transformantes obtenidos de tal forma que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células hospedadoras eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión, tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1 o pEGFP-C1, los polipéptidos pueden expresarse como diversas proteínas de fusión marcadas con una etiqueta de His (por ejemplo, (His)<sub>6</sub> a (His)<sub>10</sub>), una etiqueta FLAG, una etiqueta myc, una etiqueta de HA, GFP, o etiquetas similares.

Los vectores de expresión pueden introducirse en las células hospedadoras mediante métodos bien conocidos, tales como electroporación, un método con fosfato de calcio, un método con liposomas, un procedimiento con DEAE dextrano, microinyección, infección vírica, lipofección y unión con péptidos que penetran en las células.

El polipéptido de interés puede aislarse y purificarse de las células hospedadoras mediante una combinación de operaciones de separación conocidas en la materia. Como ejemplos de ello se incluyen, pero sin limitación, tratamiento con un desnaturalizante (por ejemplo, urea) o un tensioactivo, ultrasonidos, digestión enzimática, desalinización, 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.

Los antígenos preparados de este modo pueden utilizarse como antígenos sensibilizantes, como se describe más adelante, para producir el anticuerpo según la presente invención.

<Estructura de los anticuerpos>

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 la IgM, son glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 kDa, cada una compuesta por dos cadenas ligeras (L, *light*) idénticas y dos cadenas pesadas (H, *heavy*) idénticas. Normalmente, cada cadena ligera está conectada a una cadena pesada mediante un solo enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro entre las cadenas pesadas varía entre los diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada una de las cadenas pesada y ligera también tiene un enlace disulfuro intracadena. 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, *complementarity determining regions*) en los dominios variables del anticuerpo presentan una variabilidad específica e imparten especificidad de unión al anticuerpo. Las partes relativamente conservadas en las regiones variables se denominan regiones estructurales (FR, siglas del inglés *framework regions*). Cada uno de los dominios variables completos de la cadena pesada y ligera comprenden cuatro FR conectadas a través de tres CDR. Estas tres CDR se denominan CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en este orden desde el extremo N de la cadena pesada. Del mismo modo, las CDR se denominan CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en la cadena ligera. La CDRH3 es la más importante para la especificidad de unión del anticuerpo por su antígeno. Además, las CDR en cada cadena se mantienen próximas entre sí mediante las regiones FR y contribuyen a la formación de un sitio de unión a antígeno en el anticuerpo, junto con las CDR en la otra cadena. Las regiones constantes no contribuyen directamente a la unión entre el anticuerpo con el antígeno, pero muestran diversas funciones efectoras, por ejemplo, implicación en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (AD-CC, *antibody-dependent cellular cytotoxicity*), fagocitosis mediada por la unión a un receptor Fc, semivida/velocidad de eliminación mediada por un receptor Fc neonatal (FcRn) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediada por un componente C1q en la cascada del complemento.

<Preparación de anticuerpos>

El anticuerpo anti CAPRIN-1 según la presente divulgación, significa un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con una proteína CAPRIN-1 de longitud completa o con un fragmento de la misma. En particular, el anticuerpo anti CAPRIN-1 de la presente invención es un anticuerpo que se une inmunológicamente a un polipéptido parcial de una proteína CAPRIN-1 (polipéptido parcial de CAPRIN-1) que es un péptido que consta de la secuencia de aminoácidos que contiene el epítipo expuesto en la SEQ ID NO: 5. Preferentemente, el anticuerpo de la presente invención reconoce un epítipo que consta de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos, en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. Este anticuerpo anti CAPRIN-1 de la presente invención es capaz de unirse específicamente a la proteína CAPRIN-1 de longitud completa. El anticuerpo de la presente invención puede obtenerse seleccionando, como antígeno, de entre los anticuerpos obtenidos con proteínas CAPRIN-1 o fragmentos de las mismas y según un método habitual, un anticuerpo que se une inmunológicamente al polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 o al polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 % o más, aún más preferentemente 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos.

En este contexto, la "reactividad inmunológica" significa la propiedad del anticuerpo de unirse *in vivo* al antígeno de CAPRIN-1 (una proteína CAPRIN-1 de longitud completa o un polipéptido parcial de la misma). Mediante dicha unión a CAPRIN-1, el anticuerpo de la presente invención ejerce la función de dañar (por ejemplo, destruir, suprimir o causar la regresión de) las células tumorales. El anticuerpo de la presente invención puede dañar tumores, por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso (por ejemplo, cáncer de colon), cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma, a través de la unión con la proteína CAPRIN-1.

El anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo. Como ejemplos del tipo de anticuerpo de la presente invención se incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos monocatenarios y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')<sub>2</sub> y Fv). Además, el anticuerpo es de cualquier clase de molécula de inmunoglobulina, 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 acetilación, formilación, amidación, fosforilación, PEGilación o modificaciones similares, además de glucosilación.

En lo sucesivo, se mostrarán ejemplos de preparación de diversos anticuerpos.

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, una línea celular de cáncer

de mama SK-BR-3 que expresa CAPRIN-1, se administra a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de este ratón. Después de la separación de los esplenocitos, las células se fusionan con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto inhibitor sobre crecimiento de células cancerosas, se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridomas). Como alternativa, pueden seleccionarse clones que producen anticuerpos que se unen a un polipéptido que consta de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 o a un polipéptido que consta de una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos. Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales que tienen un efecto inhibitor sobre el crecimiento de células cancerosas o los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra el polipéptido de SEQ ID NO: 5 o similares, se aíslan y se cultivan. El anticuerpo de la presente invención puede prepararse por purificación a partir del sobrenadante de cultivo según un método general de purificación por afinidad.

Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales pueden prepararse, por ejemplo, de la siguiente manera: en primer lugar, los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes según un método conocido en la materia. Este método de inmunización implica generalmente, inyectar a mamíferos, por vía intraperitoneal o subcutánea, el antígeno sensibilizante. Específicamente, los antígenos sensibilizantes se diluyen con, o suspenden en, PBS (solución salina tamponada con fosfato), solución salina fisiológica, o similar, en una cantidad apropiada y después, si se desea, se mezclan con una cantidad apropiada de un adyuvante convencional, por ejemplo, un adyuvante completo de Freund. Después de la emulsificación, la emulsión resultante se administra a cada mamífero varias veces cada 4 a 21 días. Como alternativa, para la inmunización con los antígenos sensibilizantes, puede utilizarse un transportador apropiado.

Después de confirmar un aumento del nivel del anticuerpo deseado en el suero del mamífero inmunizado de este modo, los inmunocitos se recogen del mamífero y se someten a fusión celular. Como ejemplos preferidos de inmunocitos se incluyen particularmente esplenocitos.

Las células de mieloma de mamífero se utilizan como células progenitoras asociadas para fusionarse con los inmunocitos. En la materia se conocen diversas líneas celulares, por ejemplo, P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (deSt. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) y R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133), se utilizan preferentemente como células de mieloma.

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

De manera más específica, 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 utiliza polietilenglicol (PEG) o virus hemoaglutinante de Japón (VHJ). Si se desea, para mejorar la eficacia de la fusión, puede añadirse adicionalmente un auxiliar, tal como dimetilsulfóxido.

La proporción entre los inmunocitos y las células de mieloma puede ajustarse de manera arbitraria. Por ejemplo, la cantidad de inmunocitos se establece preferiblemente en 1 a 10 veces la cantidad de células de mieloma. Como ejemplos de medios que pueden utilizarse en la fusión celular se incluyen RPMI1640 y medios MEM adecuados para el crecimiento de líneas celulares de mieloma, así como medios convencionales para su uso en este tipo de cultivo celular. Asimismo, en combinación con estos medios, puede utilizarse un complemento de suero, tal como suero bovino fetal (FCS, *fetal calf serum*).

Para la fusión celular, se mezclan los inmunocitos y las células de mieloma en una cantidad predeterminada del medio. Una solución de PEG (peso molecular promedio: por ejemplo, de aproximadamente 1 000 a 6 000) precalentada a aproximadamente 37 °C se añade normalmente a la mezcla a una concentración de 30 a 60 % (p/v) y se mezcla con la misma para formar los hibridomas de interés. Posteriormente, para eliminar los agentes de fusión celular o similares, desfavorables para el crecimiento de los hibridomas, se repiten preferentemente los procedimientos de adición secuencial de un medio apropiado y de eliminación del 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. Durante un periodo de tiempo suficiente (normalmente, de varios días a varias semanas), este cultivo continúa en el medio HAT para que se produzca la muerte de las células (células no fusionadas) distintas de los hibridomas de interés. Posteriormente, los hibridomas que producen el anticuerpo de interés se criban y se clonan como clones individuales mediante un método de dilución limitante convencional.

Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, pueden obtenerse hibridomas productores de anticuerpos humanos que tengan la actividad deseada (por ejemplo, actividad inhibitor sobre el crecimiento celular) sensibilizando linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con el virus de EB (Epstein-Barr), con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas

*in vitro* y fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma de origen humano que pueden dividirse permanentemente, por ejemplo, U266 (N.º de Registro TIB196).

5 Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales preparados de este modo pueden subcultivarse en un medio convencional y también pueden conservarse durante un largo periodo en nitrógeno líquido.

10 Específicamente, los antígenos deseados o las células que expresan los antígenos deseados, se utilizan como antígenos sensibilizante en la inmunización según un método de inmunización convencional. Los inmunocitos obtenidos se fusionan con células progenitoras conocidas en la materia según un método de fusión celular convencional. Las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) pueden cribarse mediante un método de cribado convencional para preparar el anticuerpo de interés.

15 Otro ejemplo del anticuerpo que puede utilizarse en la presente invención es un anticuerpo policlonal. El anticuerpo policlonal puede obtenerse, por ejemplo, de la siguiente manera:

20 Se obtiene suero de animales pequeños tales como ratones, ratones que producen anticuerpos humanos, o conejos inmunizados con proteínas CAPRIN-1 naturales o proteínas CAPRIN-1 recombinantes expresadas como proteínas de fusión con GST o similar en microorganismos tales como *E. coli*, o péptidos parciales de los mismos. Como alternativa, puede obtenerse suero de mamíferos inmunizados con fragmentos de CAPRIN-1 que sirven como antígenos sensibilizantes, es decir, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 o una secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 % o más, aún más preferentemente 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos (preferentemente, un polipéptido que consta de cualquiera de estas secuencias de aminoácidos), o un polipéptido que comprende un epítipo (que consta, preferentemente, del epítipo) que consta de aproximadamente 7 a 12 amino consecutivos ácidos, por ejemplo, de 8 a 11 aminoácidos consecutivos, en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 o la secuencia de aminoácidos que tiene 80 % o más, preferentemente 85 % o más, más preferentemente 90 % o más, aún más preferentemente 95 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos. El suero así obtenido puede purificarse utilizando, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columnas de proteína A o proteína G, cromatografía de intercambio iónico con DEAE, o columnas de afinidad acopladas con proteínas CAPRIN-1 o péptidos sintéticos para preparar anticuerpos policlonales anti CAPRIN-1. El anticuerpo policlonal de la presente invención incluye anticuerpos obtenidos de animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) inmunizados con proteínas CAPRIN-1.

35 En este contexto, por ejemplo, como ratones productores de anticuerpos humanos, se conocen los ratones KM (Kirin Pharma Co., Ltd./Medarex) y los ratones Xeno (Amgen Inc.) (por ejemplo, N.º de publicación internacional). WO02/43478 y WO02/092812). Se pueden obtener anticuerpos policlonales humanos completos, o fragmentos de los mismos, de la sangre de dichos ratones inmunizados con proteínas CAPRIN-1. Como alternativa, se pueden aislar esplenocitos de los ratones inmunizados de este modo y fusionados con células de mieloma. De esta manera, se pueden obtener anticuerpos monoclonales humanos.

40 Los antígenos pueden prepararse, por ejemplo, según un método que utilice células animales (publicación de patente JP (Kohyo) N.º 2007-530068 A) o según un método que utilice baculovirus (por ejemplo, publicación internacional N.º WO98/46777). Para la inmunización, los antígenos que tienen baja inmunogenicidad pueden unirse a macromoléculas inmunogénicas tales como albúmina. Para la inmunización, los antígenos pueden administrarse junto con adyuvantes.

50 Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede obtenerse como un anticuerpo genéticamente recombinante producido utilizando una técnica de recombinación de genes que implica: clonar un gen del anticuerpo a partir de hibridomas; incorporar el gen del anticuerpo en vectores apropiados; e introducir los vectores a hospedadores (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 codificantes de las regiones V del anticuerpo de interés, los ADN se ligan con ADN codificantes de las regiones constantes (regiones C) del anticuerpo deseado. Los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión. Como alternativa, los ADN codificantes de la región V del anticuerpo pueden incorporarse en vectores de expresión que contienen los 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 hospedadoras pueden transformarse con los vectores de expresión resultantes y se deja que expresen el anticuerpo.

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

65 El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, ratón, rata, conejo y 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 proteínas CAPRIN-1 o con fragmentos de las mismas y células de mieloma. El anticuerpo quimérico es un anticuerpo preparado a partir de una combinación de secuencias derivadas de animales diferentes y es, por ejemplo, un anticuerpo compuesto por regiones variables de cadena pesada y ligera de anticuerpo de ratón y regiones constantes de cadena pesada y ligera de anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico puede prepararse utilizando un método conocido en la técnica y que implica, por ejemplo: ligar los ADN que codifican las regiones V del anticuerpo de ratón con los ADN que codifican las regiones C del anticuerpo humano; incorporar los productos del ligamiento resultantes en vectores de expresión; e introducir los vectores en hospedadores para que se produzcan esos anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales que tienen reactividad inmunológica con el polipéptido parcial de CAPRIN-1 que constan de la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5 y que tienen un efecto antitumoral, se preparan mediante un método descrito más adelante en los Ejemplos.

El anticuerpo humanizado, también denominado anticuerpo humano remodelado, es un anticuerpo genomodificado. El anticuerpo humanizado se construye introduciendo en regiones determinantes de complementariedad de anticuerpos humanos, las CDR de anticuerpos derivados de un animal inmunizado. También se conoce una estrategia general de recombinación génica.

Específicamente, secuencias de ADN diseñadas para unir, por ejemplo, las CDR de anticuerpos de ratón, conejo o pollo, y las regiones estructurales (FR) de anticuerpos humanos se sintetizan mediante PCR utilizando varios oligonucleótidos preparados que tienen partes terminales superpuestas entre sí. Los ADN obtenidos se ligan con ADN codificantes de regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de ligamiento resultantes se incorporan en vectores de expresión, que después se introducen en hospedadores para la producción de anticuerpos para obtener el anticuerpo de interés (véase la publicación de solicitud de patente europea N.º EP239400 y la publicación internacional N.º WO96/02576). Las FR de anticuerpos humanos conectadas mediante las CDR se seleccionan de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno favorable. En caso necesario, los aminoácidos en las regiones estructurales de las regiones variables de anticuerpo pueden sustituirse de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humano remodelado resultante, formen un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Asimismo, estas FR pueden reemplazarse por regiones estructurales derivadas de diversos anticuerpos humanos de diferentes clases o subclases de ellos (véase la publicación internacional N.º WO99/51743).

Las regiones estructurales de anticuerpo humano conectadas mediante las CDR se seleccionan de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad formen un sitio de unión a antígeno favorable. En caso necesario, los aminoácidos en las regiones estructurales de las regiones variables de anticuerpo pueden sustituirse de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humano remodelado resultante, formen un sitio de unión a antígeno adecuado (Sato K. y col., Cancer Research 1993, 53: 851-856).

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

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

Como ejemplos de anticuerpos modificados pueden incluirse 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. En la materia ya se ha establecido un método para esto.

En este contexto, la expresión "funcionalmente equivalente" significa que un anticuerpo en cuestión tiene actividad biológica o bioquímica similar a la del anticuerpo de la presente invención, específicamente, el anticuerpo en cuestión tiene la función de dañar el tumor y esencialmente no causa rechazo cuando se aplica, por ejemplo, a seres humanos. Como ejemplos de dicha actividad pueden incluirse la actividad inhibidora sobre el crecimiento celular y la actividad de unión.

Los expertos en la materia conocen bien un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a un

determinado polipéptido, que implica la introducción de una mutación en un polipéptido. Por ejemplo, los expertos en la técnica pueden introducir apropiadamente una mutación en el anticuerpo de la presente invención, utilizando mutagénesis dirigida (Hashimoto-Gotoh, T. et al., (1995) *Gene* 152, 271-275; Zoller, MJ. y Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468-500; Kramer, W. et al., (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456; Kramer, W. y Fritz, HJ., (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350-367; Kunkel, TA., (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82, 488-492; y Kunkel (1988) *Methods Enzymol.* 85, 2763-2766) o similares, preparando de ese modo un anticuerpo funcionalmente equivalente al anticuerpo de la presente invención.

El anticuerpo que reconoce un epítipo de una proteína CAPRIN-1 o un polipéptido de un fragmento de CAPRIN-1 que comprende el epítipo, puede obtenerse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el anticuerpo puede obtenerse mediante un método que implique determinar el epítipo de la proteína CAPRIN-1 reconocido por el anticuerpo anti CAPRIN-1 obtenido que tiene un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de células cancerosas mediante un método convencional (por ejemplo, mapeo epitópico o un método de identificación de epítipos descrito más adelante) y preparar un anticuerpo utilizando, como inmunógeno, un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos contenida en el epítipo, o un método que implica determinar un epítipo para un anticuerpo preparado por un método convencional y seleccionar un anticuerpo que reconozca el mismo epítipo que el del anticuerpo anti CAPRIN-1. En este contexto, el "epítipo" se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente, en seres humanos. Su unidad más pequeña consta de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, preferentemente de 8 a 11 aminoácidos.

Sujeto a los requisitos adicionales de las reivindicaciones, el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo que tiene reactividad inmunológica con CAPRIN-1, un anticuerpo que reconoce específicamente a CAPRIN-1, o un anticuerpo que se une específicamente a CAPRIN-1 y presenta actividad citotóxica contra un cáncer o un efecto inhibitorio sobre el crecimiento tumoral. El anticuerpo es, preferentemente, un anticuerpo que tiene una estructura que causa poco o ningún rechazo en los animales receptores. Los ejemplos de dichos anticuerpos incluyen anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos (por ejemplo, anticuerpos quiméricos de ser humano-ratón), anticuerpos monocatenarios, y anticuerpos biespecíficos cuando los animales receptores son seres humanos. Estos anticuerpos tienen regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de un anticuerpo humano o tienen regiones variables de cadena pesada y ligera con regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) derivadas de un anticuerpo animal no humano y regiones estructurales (FR1, FR2, FR3 y FR4) derivadas de un anticuerpo humano. Como alternativa, estos anticuerpos son anticuerpos recombinantes 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. El anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, los dos anticuerpos anteriores.

Dichos anticuerpos recombinantes pueden prepararse de la siguiente manera: Los ADN codificantes de anticuerpos monoclonales (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ser humano, ratón, rata, conejo o pollo) contra CAPRIN-1 humana, se clonan a partir de células productoras de anticuerpos, tales como hibridomas, y se utilizan como moldes en la RT-PCR o similar, para preparar ADN codificantes de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada de los anticuerpos. Las secuencias respectivas de las regiones variables de cadena ligera y cadena pesada, las secuencias respectivas de CDR1, CDR2 y CDR3 en cada región, o las secuencias respectivas de FR1, FR2, FR3 y FR4 en cada región, pueden determinarse en función de, por ejemplo, el sistema de numeración EU de Kabat (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed. Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Dicho ADN codificante de cada región variable o un ADN codificante de cada CDR, se prepara utilizando una técnica de recombinación de genes (Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) o un sintetizador de ADN. En este contexto, inmunizando a animales productores de anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) con CAPRIN-1 humana, y fusionando después esplenocitos extirpados de los animales inmunizados, con células de mieloma, pueden prepararse hibridomas productores de anticuerpos monoclonales humanos. Además de esto, en caso necesario, utilizando una técnica de recombinación de genes o un sintetizador de ADN, se preparan ADN codificantes de regiones variables y constantes de cadena ligera o cadena pesada derivadas de anticuerpos humanos.

Para el anticuerpo humanizado, para preparar un ADN codificante del anticuerpo humanizado, pueden prepararse ADN en los que las secuencias codificantes de CDR en los ADN codificantes de regiones variables de cadena ligera o pesada derivadas de anticuerpos humanos, están sustituidas por las correspondientes secuencias codificantes de CDR de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo) y ligadas con los ADN codificantes de regiones constantes de cadena ligera o pesada derivadas de anticuerpos humanos.

Para el anticuerpo quimérico, para preparar un ADN codificante del anticuerpo quimérico, ADN codificantes de regiones variables de cadena ligera o pesada de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo) pueden ligarse con ADN codificantes de regiones constantes de cadena ligera o pesada derivadas de anticuerpos humanos.

El anticuerpo monocatenario se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena pesada y ligera unidas linealmente entre sí a través de un enlazador. Se puede preparar un ADN codificante del anticuerpo

monocatenario ligando un ADN que codifica la región variable de cadena pesada, un ADN codificante del enlazador y un ADN codificante de la región variable de cadena ligera. En este contexto, ambas regiones variables de cadena pesada y ligera derivan de un anticuerpo humano o de un anticuerpo humano que solo tiene CDR sustituidas por CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo). El enlazador consta de 12 a 19 aminoácidos. Como ejemplos de los mismos se incluyen (G<sub>4</sub>S)<sub>3</sub> que consta de 15 aminoácidos (G.B. Kim et al., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

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

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

Como ejemplos del anticuerpo de la presente invención, preparados por cualquiera de los métodos descritos anteriormente, se incluyen los siguientes anticuerpos (a) y (b):

(a) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14 (por ejemplo, un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 15); y

(b) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20 y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 (por ejemplo, un anticuerpo constituido por una región variable de cadena pesada de la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera de la SEQ ID NO: 25).

En este contexto, las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 corresponden a la región variable de cadena pesada de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 12, 13 y 14 corresponden a la región variable de cadena ligera de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 18, 19 y 20 corresponden a la región variable de cadena pesada de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 corresponden a la región variable de cadena ligera de CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente.

Como ejemplos del anticuerpo humanizado, del anticuerpo quimérico, del anticuerpo monocatenario o del anticuerpo biespecífico de la presente invención, se incluyen los siguientes anticuerpos (i) a (iii), por ejemplo, en forma de (a):

(i) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 que consta de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y regiones estructurales derivadas de anticuerpos humanizados y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 que consta de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente, y regiones estructurales derivadas de anticuerpos humanos;

(ii) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 que consta de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las regiones estructurales derivadas de anticuerpos humanos, y una región constante de cadena pesada derivada de anticuerpos humanos, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1, CDR2 y CDR3 que consta de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente, y las regiones estructurales derivadas de anticuerpos humanos, y una región constante de cadena ligera derivada de anticuerpos humanos; y

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

Las secuencias de las regiones constantes y variables de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se encuentran disponibles a través de, por ejemplo, NCBI (EE.UU.; GenBank, UniGene, etc.). Por ejemplo, las siguientes secuencias pueden referirse a: Número de registro J00228 para una región constante de cadena pesada de IgG1 humana; Número de registro J00230 para una región constante de cadena pesada de IgG2 humana; Número de registro X03604 para una región constante de cadena pesada de IgG3 humana; Número de registro K01316 para una región constante de cadena pesada de IgG4 humana; Números de registro V00557, X64135, X64133, etc. para una región constante k de cadena ligera humana; y Números de registro X64132, X64134, etc. para una región constante  $\lambda$  de cadena ligera humana.

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

Las secuencias particulares anteriores de las regiones variables de cadena pesada y ligera y las CDR en cada anticuerpo se proporcionan meramente con fines ilustrativos. Es obvio que el anticuerpo de la presente invención no está limitado por las secuencias particulares. Se preparan hibridomas capaces de producir anticuerpos humanos anti CAPRIN-1 humana o anticuerpos animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos de ratón) diferentes de los descritos anteriormente, y los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas, se recuperan y se evalúan como que son (o como que no son) anticuerpos de interés con actividad de unión inmunológica contra CAPRIN-1 humana y actividad citotóxica como indicadores. De este modo, se identifican hibridomas de interés que producen anticuerpos monoclonales. Después, los ADN codificantes de regiones variables de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos de interés se producen a partir de los hibridomas y se secuencian, como se ha descrito anteriormente. Los ADN se utilizan para la preparación de diferentes anticuerpos.

Cada uno de los anticuerpos anteriores puede tener la sustitución, delección o adición de uno o varios aminoácidos, particularmente en una secuencia de región estructural y/o una secuencia de región constante, siempre que el anticuerpo resultante tenga una especificidad tal que pueda reconocer específicamente a CAPRIN-1. En este contexto, el término "varios" significa preferentemente de 2 a 5, más preferentemente 2 o 3.

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

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

Como ejemplos del agente antitumoral se incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, piposulfán, benzodopa, carbocina, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilnmelamina, trietilnefosforamida, trietilnifosforamida, trimetilnmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatina, clorambucilo, clorofazina, 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, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido froilínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatratato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitanina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina y sales y sus derivados farmacéuticamente aceptables.

Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede administrarse en combinación con un agente antitumoral para producir un mayor efecto terapéutico. Esta estrategia es adaptable a un paciente con cáncer que

expresa CAPRIN-1 antes o después de una intervención quirúrgica. Esta estrategia puede aplicarse, particularmente después de la cirugía, para un cáncer que expresa CAPRIN-1, que se ha tratado convencionalmente solo con un agente antitumoral, para producir mayor prevención de recidiva de cáncer o para prolongar el tiempo de supervivencia.

- 5 Como ejemplos del agente antitumoral utilizado en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención, también se incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos públicamente en la bibliografía, etc.: paclitaxel, doxorubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfán, improsulfán, pipsulfán, benzodopa, carbocuna, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenefosforamida, trietilenfosforamida, trimetilolmelamina, bulatacina, butalacina, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongiatina, clorambucilo, clorofazina, 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, idarrubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestanol, mepitioestano, testolactona, aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido prolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuaona, elfornitina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, loxoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxano, rizoxina, esquizofilano, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuaona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sus sales (conocidas en la técnica) y derivados (conocidos en la técnica) farmacéuticamente aceptables. De estos agentes antitumorales, se utiliza particularmente ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel o vinorelbina.

- Como alternativa, el anticuerpo de la presente invención puede unirse a un radioisótopo conocido públicamente en la bibliografía, etc., tal como,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{175}\text{Lu}$ ,  $^{176}\text{Lu}$ ,  $^{89}\text{Sr}$ ,  $^{64}\text{Cu}$  u  $^{111}\text{In}$  (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.

<Identificación de epítomos>

- 40 Como se muestra en los siguientes ejemplos, el anticuerpo de la presente invención se une a un epítomo en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 5. Un ejemplo de un método para confirmar un epítomo para el anticuerpo de la presente invención, incluye un método que implica la inmovilización de un epítomo en el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 en una placa y evaluar la reactividad del anticuerpo con este epítomo. Específicamente, un epítomo en el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 se inmoviliza a través de la reacción en una placa unida con grupos funcionales que extraen electrones a través de espaciadores tales como oligoetilenglicol. El anticuerpo de la presente invención se puede hacer reaccionar con la placa y su reactividad con el epítomo puede evaluarse a través de la reacción con un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, marcado con peroxidasa de rábano picante (HRP)) que se une al anticuerpo de la presente invención, es decir, el epítomo al que se une el anticuerpo de la presente invención puede confirmarse. El epítomo en el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 utilizado en la inmovilización sobre una placa es una secuencia que en sí misma comprende al menos el epítomo en la secuencia de la SEQ ID NO: 5 o una parte modificada de la misma (por ejemplo, restos N-terminales o C-terminales modificados con varios aminoácidos arbitrarios o una proteína, tal como KLH o un (poli) péptido modificado con una proteína MAP). El anticuerpo de la presente invención solo necesita unirse a cualquiera de estos (poli) péptidos.

- 55 Por otro lado, en el método anterior, incluso el anticuerpo de la presente invención puede ser no reactivo con el polipéptido de la SEQ ID NO: 5, es decir, el epítomo puede no estar confirmado. En este caso, el anticuerpo reacciona con un antígeno en condiciones de solución que facilitan la unión entre el antígeno y el anticuerpo. Después de obtener un complejo de antígeno-anticuerpo mediante un método de inmunoprecipitación, un polipéptido parcial unido con el anticuerpo se puede separar y examinar para determinar su secuencia de aminoácidos para confirmar el epítomo para el anticuerpo de la presente invención. En este contexto, el antígeno es, por ejemplo, el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 en sí mismo o una parte modificada de la misma. Como alternativa, incluso una proteína CAPRIN-1 puede utilizarse siempre que el epítomo reactivo con el anticuerpo de la presente invención pueda confirmarse mediante el método anterior.

- 65 <Efecto antitumoral>

El efecto antitumoral del anticuerpo anti CAPRIN-1 utilizado en la presente invención en células cancerosas que expresan CAPRIN-1, parece ser provocado por el siguiente mecanismo: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos mediada por células efectoras (ADCC) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) contra células que expresan CAPRIN-1. Sin embargo, este mecanismo no pretende limitar el alcance de la presente invención.

5 Se sabe que el efecto antitumoral basado en el mecanismo se correlaciona con el número de moléculas diana expresadas en la superficie de las células cancerosas a las que se une el anticuerpo (Niwa R., Clinical Cancer Research 15 de marzo de 2005; 11 (6): 2327-2336). El número de moléculas diana expresadas en la superficie de las células cancerosas puede examinarse utilizando un kit de ensayo existente capaz de medir el número de moléculas de la superficie celular. Específicamente, el número de moléculas diana a las que se une el anticuerpo se puede determinar: haciendo reaccionar anticuerpos primarios, tales como anticuerpos contra las moléculas diana, con células cancerosas; haciendo reaccionar con ellos, anticuerpos marcados con fluorescencia contra los anticuerpos primarios junto con perlas para una curva de calibración con el número conocido de moléculas; y midiendo la intensidad de fluorescencia media de las muestras para obtener una curva de calibración.

15 Por lo tanto, la actividad del anticuerpo anti CAPRIN-1 utilizado en la presente invención puede evaluarse, como se muestra específicamente en los siguientes ejemplos, mediante un ensayo *ex vivo* de la actividad ADCC o CDC contra las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 o examinando el número de moléculas CAPRIN-1 expresadas en la superficie de las células cancerosas utilizando, como anticuerpo primario, el anticuerpo anti CAPRIN-1 según la presente invención.

20 El anticuerpo anti CAPRIN-1 utilizado en la presente invención, se une a una proteína CAPRIN-1 en las células cancerosas y muestra un efecto antitumoral por medio de la actividad. Por lo tanto, es de suponer que el anticuerpo anti CAPRIN-1 de la presente invención es útil en el tratamiento o en la prevención de cáncer. Específicamente, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, que comprende, como principio activo, el anticuerpo anti CAPRIN-1. El anticuerpo anti CAPRIN-1 que va a utilizarse con la finalidad de administrarse en el cuerpo de un ser humano (terapia de anticuerpos) es, preferentemente, un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para reducir la inmunogenicidad.

25 Un anticuerpo anti CAPRIN-1 con mayor afinidad de unión por una proteína CAPRIN-1 en la superficie de la célula cancerosa ejerce una actividad antitumoral más fuerte. Por lo tanto, el anticuerpo de la presente invención tiene una alta afinidad de unión para la proteína CAPRIN-1 y, por lo tanto, se puede esperar que tenga un efecto antitumoral más fuerte. Por consiguiente, el anticuerpo de la presente invención es adaptable a una composición farmacéutica destinada al tratamiento y/o a la prevención de cáncer. Dicha alta afinidad de unión del anticuerpo de la presente invención es, preferentemente, de al menos  $10^7$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^8$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^8$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^9$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^9$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{10}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^{10}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{11}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $5 \times 10^{11}$  M<sup>-1</sup>, al menos  $10^{12}$  M<sup>-1</sup> o de al menos  $10^{13}$  M<sup>-1</sup>, en términos de una constante de asociación (constante de afinidad)  $K_a$  ( $k_{on}/k_{off}$ ), como se ha descrito anteriormente.

30 La unión del anticuerpo anti CAPRIN-1 a un número mayor de moléculas CAPRIN-1 en la superficie de células cancerosas produce una actividad antitumoral más fuerte. De manera deseable, el número de moléculas CAPRIN-1 en el ensayo que utiliza el anticuerpo anti CAPRIN-1 de la presente invención es de  $10^4$  o más, preferentemente de  $10^5$  o más, por célula cancerosa a la que se une el anticuerpo a la espera del efecto antitumoral. Un tumor (células cancerosas) que tenga una gran cantidad de moléculas CAPRIN-1 en la superficie celular es particularmente preferido como cáncer para recibir el anticuerpo de la presente invención.

35 <Unión a células que expresan antígeno>

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

40 <Tinción inmunohistoquímica>

El anticuerpo que reconoce a CAPRIN-1 puede analizarse para determinar su reactividad con CAPRIN-1 mediante un método inmunohistoquímico bien conocido por los expertos en la materia, utilizando una sección congelada fijada en paraformaldehído o en acetona o una sección de un tejido embebida en parafina y fijada en paraformaldehído, obtenida de un paciente durante una intervención quirúrgica o de un animal que lleva un tejido de xenoinjerto inoculado con una línea celular que expresa CAPRIN-1 bien de manera espontánea o después de una transfección.

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

65 <Composición farmacéutica y método de tratamiento y/o prevención del cáncer>

Una diana de la composición farmacéutica para su uso en un método de tratamiento de cáncer de la presente invención no está particularmente limitada siempre que la diana sea cáncer (células) que expresen un gen CAPRIN-1.

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

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

15 Como ejemplos específicos de estos cánceres se incluyen, pero sin limitación, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama de tipo complejo, tumor maligno mixto de la glándula mamaria, adenocarcinoma papilar intraductal, adenocarcinoma de pulmón, cáncer de células escamosas, cáncer microcítico, glioma, que es tumor de tejido neuroepitelial, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodérmico embrionario, neurilemoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crónica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma alimentario, linfoma de tipo células pequeñas a medianas, cáncer apendicular, cáncer de colon ascendente, cáncer de colon descendente, cáncer de colon transverso, cáncer de colon sigmoideo, cáncer rectal, cáncer de ovario epitelial, tumor de células germinales, tumor de células estromales, carcinoma ductal pancreático, carcinoma ductal pancreático  
20 invasivo, adenocarcinoma pancreático, carcinoma de células acinares, carcinoma adenoescamoso, tumor de células gigantes, neoplasia mucinosa papilar intraductal, neoplasia quística mucinosa, pancreatoblastoma, 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 y VIPoma.

25 Los sujetos receptores (pacientes) son, preferentemente, mamíferos, por ejemplo, mamíferos, incluyendo primates, animales de compañía, ganado y animales de deporte, y, particularmente, se prefiere que sean seres humanos, perros y gatos.

30 En el caso de utilizar el anticuerpo de la presente invención como una composición farmacéutica, la composición farmacéutica puede formularse mediante un método generalmente conocido por los expertos en la materia. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede utilizarse 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 apropiada con transportadores o medios  
35 farmacológicamente aceptables, específicamente, agua esterilizada, solución salina fisiológica, aceites vegetales, un emulsionante, un agente de suspensión, un tensioactivo, un estabilizante, un agente aromatizante, un excipiente, un vehículo, un conservante, un aglutinante, etc. La cantidad de principio activo en dicha preparación se determina de tal manera que puede obtenerse una dosis adecuada dentro del intervalo prescrito.

40 Una composición aséptica para inyección puede formularse según la práctica farmacéutica convencional utilizando un vehículo, tal como agua destilada inyectable.

45 Como ejemplos de soluciones acuosas para inyección se 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 pueden utilizarse en combinación con un solubilizante apropiado, por ejemplo, un alcohol (específicamente, etanol) o un polialcohol (por ejemplo, propilenglicol y polietilenglicol), o un tensioactivo no iónico, por ejemplo, polisorbato 80(TM) o HCO-60.

50 Como ejemplos de soluciones oleaginosas se incluyen aceite de sésamo y aceite de soja. Estas soluciones pueden utilizarse en combinación con benzoato de bencilo o alcohol bencilico como solubilizante. Adicionalmente, las soluciones pueden mezclarse con un tampón (por ejemplo, una solución de tampón fosfato y una solución de tampón de acetato de sodio), un agente calmante (por ejemplo, clorhidrato de procaína), un estabilizante (por ejemplo, alcohol bencilico y fenol), y un antioxidante. Las soluciones para inyección preparadas de este modo se cargan normalmente en ampollas adecuadas.

55 La composición farmacéutica de la presente divulgación es para administrarse por vía oral o parenteral, preferentemente por vía parenteral. Como ejemplos específicos de sus formas de dosificación se incluyen inyecciones, agentes de administración intranasal, agentes de administración transpulmonar y agentes de administración percutánea. Como ejemplos de las inyecciones se incluyen inyección intravenosa, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal e inyección subcutánea, a través de las cuales la composición farmacéutica puede administrarse por  
60 vía sistémica o local.

65 Además, el método de administración puede seleccionarse apropiadamente dependiendo de la edad, el peso, el sexo, los síntomas, etc. de un paciente. La dosis de una composición farmacéutica que contiene el anticuerpo o un polinucleótido que codifica el anticuerpo, puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por ejemplo, 0,0001 a 1000 mg/kg de peso corporal por dosis. Como alternativa, la dosis puede seleccionarse dentro de un intervalo de, por

ejemplo, 0,001 a 100000 mg/cuerpo de un paciente, aunque la dosis no se limita necesariamente a estos valores numéricos. Aunque la dosis y el método de administración varían dependiendo del peso, la edad, el sexo, los síntomas, etc. de un paciente, los expertos en la materia pueden seleccionar apropiadamente la dosis y el método.

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

10 La presente divulgación abarca además un método para tratar y/o prevenir el cáncer, que comprende administrar a un sujeto, la composición farmacéutica de la presente invención en combinación con el agente antitumoral como se ha ilustrado anteriormente o una composición farmacéutica que comprende dicho agente antitumoral. El anticuerpo de la presente invención, o el fragmento del mismo, puede administrarse al sujeto simultáneamente con el agente antitumoral o por separado. En el caso de administrar por separado estas composiciones farmacéuticas, cualquiera de ellas puede administrarse primero o después. Un especialista puede seleccionar sus intervalos de dosificación, dosis, vías de administración y número de dosis. Otras formas de dosificación de fármacos para administrar simultáneamente también incluyen, por ejemplo, composiciones farmacéuticas formulada mezclando el anticuerpo de la presente invención o el fragmento del mismo y el agente antitumoral con un transportador (o medio) farmacológicamente aceptable. Las descripciones anteriores sobre la prescripción, la formulación, las vías de administración, las dosis, el cáncer, etc. referentes a las composiciones farmacéuticas y a 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 descritas anteriormente que contienen el agente antitumoral.

25 Por lo tanto, la presente invención también proporciona un fármaco de combinación que comprende la composición farmacéutica de la presente invención y una composición farmacéutica que comprende el agente antitumoral como se ilustró anteriormente, y también desvela un método para tratar y/o prevenir cáncer, que comprende administrar al fármaco de combinación. La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo de la presente invención o el fragmento de la misma y el agente antitumoral junto con un transportador farmacológicamente aceptable.

30 <Polipéptido y ADN>

35 La presente invención proporciona además un ADN como se define en las reivindicaciones que codifica el anticuerpo de la presente invención o el fragmento (fragmento de unión a anticuerpo) del mismo. Dicho ADN puede ser un ADN codificante de las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo o puede ser un ADN codificante de las regiones variables de las cadenas pesada y/o ligera del anticuerpo. Dicho ADN también puede ser un ADN codificante de cada una, o de una combinación, de las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo. Dicho ADN incluye, por ejemplo, un ADN que codifica una región variable de cadena pesada que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 y un ADN que codifica la región variable de cadena ligera que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, en el caso del anticuerpo (a).

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

50 Otros ejemplos del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluyen un ADN codificante de una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11, y un ADN codificante de una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15, en el caso del anticuerpo (a). En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16. La secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 es, por ejemplo, la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17. Cuando dicho ADN comprende una región que codifica cada región constante en las cadenas pesada y ligera, esta región comprende preferentemente una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de anticuerpo humano correspondiente (secuencia de aminoácidos de cada región constante en las cadenas pesada y ligera).

65 Estos ADN de anticuerpo pueden obtenerse, por ejemplo, mediante los métodos descritos anteriormente o mediante el siguiente método: en primer lugar, los ARN totales se preparan a partir de hibridomas que producen el anticuerpo de la presente invención utilizando un kit de extracción de ARN disponible en el comercio, y los ADNc se sintetizan

utilizando transcriptasa inversa y cebadores al azar o similares. Posteriormente, los ADNc que codifican el anticuerpo se amplifican por PCR utilizando cebadores oligonucleotídicos para secuencias conservadas de cada región variable en genes conocidos de cadena pesada y ligera de anticuerpos de ratón. Las secuencias que codifican las regiones constantes pueden obtenerse mediante la amplificación por PCR de secuencias conocidas. Para la secuenciación, la secuencia de nucleótidos del ADN puede incorporarse, por ejemplo, en un plásmido o en un fago, por ejemplo, y determinarse según un método habitual.

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

- 10 (i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11 o 21, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16 o 26);  
 (ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 o 25, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17 o 27);  
 15 (iii) un polipéptido de CDR de cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, y las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, y un ADN que codifica el polipéptido; y  
 (iv) un polipéptido de CDR de cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, y las SEQ ID NO: 22, 23 y 24, y un ADN que codifica el polipéptido.

20 Estos polipéptidos y ADN pueden prepararse utilizando técnicas de recombinación de genes como se describió anteriormente.

<Sumario de la presente invención>

25 Los aspectos de la presente invención descritos anteriormente son como se definen en las reivindicaciones.

### Ejemplos

30 En lo sucesivo, 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 Análisis de expresión de CAPRIN-1 en cada tejido

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

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

##### (1) Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón

50 Cien µg de proteína CAPRIN-1 humana, que tenía la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, preparada como en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526, se mezclaron con una misma cantidad de adyuvante MPL+TDM (fabricado por Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se utilizó como una solución de antígeno por ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de vida (producidos por Japan SLC, Inc.). Después, para completar la inmunización, se realizaron 7 refuerzos semanales. Tres días después de la última inyección, se extrajo el bazo de cada ratón y se trituró entre dos portaobjetos de vidrio esterilizados. Los procedimientos de lavado con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) y la eliminación del sobrenadante por centrifugación a 1 500 rpm durante 10 minutos, se repitieron tres veces para obtener esplenocitos. Los esplenocitos obtenidos se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas en la ATCC) a una proporción de 10:1. Doscientos µl de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10 %, se calentaron a 37 °C y se mezclaron con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH), y la solución de PEG preparada de este modo se 60 añadió a la mezcla celular, que después se dejó reposar durante 5 minutos para la fusión celular. Después de eliminar el sobrenadante por centrifugación a 1 700 rpm durante 5 minutos, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía FBS al 15 % complementado con un equivalente al 2 % de una solución HAT (fabricada por Life Technologies, Inc./Gibco) (medio selectivo HAT). Esta suspensión se añadió a quince placas de 96 pocillos (fabricadas por Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc) a 100 µl/pocillo. Para obtener hibridomas, los esplenocitos y las 65 células de mieloma se fusionaron mediante cultivo a 37 °C durante 7 días con CO<sub>2</sub> al 5 %.

Los hibridomas preparados se cribaron para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1 como indicador. Una solución de 1 µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas mediante la estrategia descrita en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526, se añadió a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T.

5 Después, a ello se añadió una solución de seroalbúmina bovina (BSA, *bovine serum albumin*) al 0,5 % (fabricada por Sigma-Aldrich Corp.) a 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se desechó la solución en cada pocillo y cada uno de estos pocillos se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, a ello se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, a ello, se añadieron

10 anticuerpos anti IgG (H+L) de ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5 000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, a ello se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del revelado del color, la reacción finalizó con la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo. Con un espectrómetro de absorción, se

15 midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producían anticuerpos que tenían alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana después, en los pocillos se observaron hibridomas que formaban colonias individuales. Las células en estos pocillos se cultivaron adicionalmente y, como indicador, los hibridomas clonados se cribaron para determinar la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra las proteínas CAPRIN-1. Una solución de 1 µg/ml de las proteínas CAPRIN-1 preparadas en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526, se añadió a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a 4 °C durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, a ello se añadió una solución de BSA al 0,5 % a 400 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 3 horas. Se desechó la solución en cada pocillo y cada uno de estos pocillos se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, a ello se añadió el sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente a 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos anti IgG (H+L) de ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 5 000 veces con PBS a 100 µl/pocillo y se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, a ello se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del revelado del color, la reacción finalizó con la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo. Con un espectrómetro de absorción, se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm. Como resultado, se obtuvieron 61 líneas de hibridoma que producían anticuerpos monoclonales reactivos con las proteínas CAPRIN-

20

25

30

35

1.

A continuación, estos anticuerpos monoclonales se cribaron en busca de anticuerpos reactivos con la superficie de células de cáncer de mama que expresaban CAPRIN-1. Específicamente, en un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml, se centrifugaron 10<sup>6</sup> células de una línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V. A ello se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente y se dejó reposar en hielo durante 1 hora. Después de lavar con PBS, a ello, se añadieron anticuerpos de cabra anti IgG de ratón marcados con FITC (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 500 veces con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejó reposar en hielo durante 1 hora. Después de lavar con PBS, utilizando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) se midió la intensidad de fluorescencia. Por otro lado, para preparar un control, se realizó la misma operación que la anterior utilizando el suero de cada ratón Balb/c de 6 semanas de vida sin tratar, diluido 500 veces con un medio para el cultivo de hibridomas, en lugar de los anticuerpos. Como resultado, se seleccionaron dos anticuerpos monoclonales (anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1) que tenían una intensidad de fluorescencia más fuerte que la del control, es decir, reaccionaban con la superficie de células de cáncer de mama.

40

45

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

Los anticuerpos monoclonales reactivos en la superficie de células cancerosas contra CAPRIN-1 (anticuerpos #1 y #2 anti CAPRIN) obtenidos en el párrafo (1), se utilizaron para identificar una región epitópica de CAPRIN-1 reconocida por ellos. Se sintetizaron 93 péptidos candidatos, cada uno de ellos con 12 a 16 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína CAPRIN-1 y cada uno de ellos se disolvió en DMSO a una concentración de 1 mg/ml.

55

Cada péptido se disolvió en una solución tampón de carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,6) a una concentración de 30 µg/ml. La solución se añadió a 100 µl/pocillo a una placa de 96 pocillos (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc./Nunc, N° de producto: 436006) y se dejó reposar durante la noche a 4 °C. Se desechó la solución en cada pocillo, y se añadió a los mismos una solución de tampón de etanolamina 10 mM/carbonato de sodio 0,1 M (pH 9,6) a 200 µl/pocillo y se dejó reposar durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se desechó la solución en cada pocillo y cada pocillo se lavó dos veces con PBS que contenía Tween 20 al 0,5 % (PBST) para preparar una placa con péptido inmovilizado.

60

65 El sobrenadante del cultivo celular que contenía el anticuerpo # 1 anti CAPRIN-1, se añadió a cada placa así obtenida a 50 µl/pocillo. Después de agitar a temperatura ambiente durante 1 hora, se desechó la solución en cada pocillo y

cada pocillo se lavó tres veces con PBST. A continuación, a ello se añadió una solución de anticuerpo secundario que contenía anticuerpos anti IgG de ratón marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) diluidos 3 000-4 000 veces con PBST, a 50 µl/pocillo. Después, se desechó la solución en cada pocillo, y cada pocillo se lavó seis veces con PBST.

5 A ello se añadió una solución de sustrato de TMB (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para provocar la reacción de color. Después del revelado del color, la reacción finalizó con la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo. Con un espectrómetro de absorción, se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm.

10 Como resultado, los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1, reaccionaron específicamente con un polipéptido de la SEQ ID NO: 5. De estos 93 péptidos candidatos cada uno de los cuales constaba de 12 a 16 aminoácidos, los polipéptidos de las SEQ ID NO: 8 y 9, que se superponen parcialmente con el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 en sus secuencias de aminoácidos, no respondieron a los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1 obtenidos en el Ejemplo 2. A partir de estos resultados, el polipéptido de la SEQ ID NO: 5 se identificó como una secuencia parcial de CAPRIN-1 específicamente reconocida por los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1 obtenidos en el Ejemplo 2(1).

### (3) Clonación de genes de región variable de los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1

20 Los anticuerpos monoclonales obtenidos en el Ejemplo 2(1) se analizaron para determinar sus secuencias de genes codificantes de la región variable y sus secuencias de aminoácidos según el método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526. Como resultado, el anticuerpo monoclonal #1 comprendía una región variable de cadena pesada que consistía en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 y una región variable de cadena ligera que consistía en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15. El anticuerpo #2 comprendía una región variable de cadena pesada que consistía en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 y una región variable de cadena ligera que consistía en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25. En la SEQ ID NO: 16 se muestra una secuencia génica que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal # 1 obtenido y en la SEQ ID NO: 17 se muestra una secuencia génica que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo. En la SEQ ID NO: 26 se muestra una secuencia génica que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo # 2 y en la SEQ ID NO: 27 se muestra una secuencia génica que codifica la región variable de la cadena ligera del mismo.

También se demostró que: el anticuerpo monoclonal # 1 obtenido en el Ejemplo 2(1) comprende la región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 11 y la región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15, en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 en la región variable de la cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 en la región variable de la cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente; y el anticuerpo # 2 comprende la región variable de la cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 21 y la región variable de la cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 25, en donde las CDR1, CDR2 y CDR3 en la región variable de la cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 18, 19 y 20, respectivamente, y las CDR1, CDR2 y CDR3 en la región variable de la cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos representadas por las SEQ ID NO: 22, 23 y 24, respectivamente.

45 Ejemplo 3 Preparación del anticuerpo policlonal contra el polipéptido parcial de CAPRIN-1 presente en la superficie de células cancerosas

50 Con el fin de obtener anticuerpos policlonales contra polipéptidos parciales de CAPRIN-1 presentes en la superficie de células cancerosas, se sintetizaron tres polipéptidos: un polipéptido (péptido derivado de CAPRIN-1 mostrado en la SEQ ID NO: 5) que comprendía la región epitópica del anticuerpo # 1 anti CAPRIN-1 obtenido en el Ejemplo 2, un polipéptido que tenía una región de restos de aminoácidos de los números 50 al 98 en la secuencia de aminoácidos de CAPRIN-1 humana de la SEQ ID NO: 2, y un polipéptido que tenía una región de restos de aminoácidos de los números 233 a 305 de la SEQ ID NO: 2. Se mezcló 1 mg de cada uno de estos péptidos como un antígeno con un mismo volumen de una solución de adyuvante incompleto de Freund (IFA, *incomplete Freund's adjuvant*). Esta mezcla se administró por vía subcutánea a cada conejo cuatro veces cada dos semanas. Después, se extrajo sangre para obtener un antisuero que contenía cada anticuerpo policlonal. Este antisuero se purificó adicionalmente utilizando un transportador de proteína G (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.) y se reemplazó con PBS para obtener anticuerpos policlonales contra polipéptidos parciales de CAPRIN-1 presentes en la superficie de células cancerosas. Asimismo, el suero de un conejo que no recibió antígeno se purificó utilizando un transportador de proteína G de la misma manera que antes y se utilizó como anticuerpos de control.

### Ejemplo 4 Análisis de expresión de la proteína CAPRIN-1 en la superficie de la membrana de células cancerosas

65 A continuación, 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1) en las que se confirmó que tenían un alto nivel de expresión del gen CAPRIN-1, se

examinaron con respecto a su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie celular. En un tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml, se centrifugaron  $5 \times 10^5$  células de cada línea celular de cáncer de mama humano en las que se confirmó de este modo que tenían expresión génica. A este, se añadieron  $2 \mu\text{g}$  ( $5 \mu\text{l}$ ) de cada uno de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRIN-1 representados por la SEQ ID NO: 5 preparada como se describe anteriormente en el Ejemplo 3 y se mezclaron con  $95 \mu\text{l}$  de PBS que contenía suero bovino fetal al 0,1 %, y se dejó reposar en hielo durante 1 hora. Después de lavar con PBS, la solución resultante se mezcló mediante la adición de  $1 \mu\text{l}$  de anticuerpos de cabra anti IgG de conejo marcados con Alexa 488 (fabricado por Invitrogen Corp.) y  $98 \mu\text{l}$  de PBS que contenía suero bovino fetal (FBS) al 0,1% y se dejó reposar en hielo durante 30 horas. Después de lavar con PBS, utilizando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) se midió la intensidad de fluorescencia. Por otro lado, para preparar un control, se realizó la misma operación que la anterior utilizando los anticuerpos de control preparados como se describe anteriormente en el Ejemplo 3 en lugar de los anticuerpos policlonales contra los péptidos derivados de CAPRIN-1. Como resultado, todas las células cancerosas complementadas con los anticuerpos anti CAPRIN-1 mostraron una intensidad de fluorescencia al menos 35 % más fuerte que la del control. Esto demuestra que las proteínas CAPRIN-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de líneas de células de cáncer humanas. La tasa anterior de incremento de la intensidad de fluorescencia se indicó mediante la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en cada línea celular y se calculó según la siguiente expresión:

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

Además, la intensidad de fluorescencia se midió en 2 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1 y Caki-2), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), 2 líneas celulares de tumores cerebrales (T98G y U87MG), una línea celular de cáncer gástrico (MKN28), 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1 y HCT-116) y 4 líneas celulares de cáncer de páncreas (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3) utilizando la misma estrategia que la anterior. Como resultado, todas las células cancerosas tenían una intensidad de fluorescencia al menos 35 % más fuerte que la del control.

Al igual que con los resultados obtenidos anteriormente, la expresión de la proteína CAPRIN-1 en la superficie de la membrana de células cancerosas también se confirmó utilizando el anticuerpo # 1 anti CAPRIN-1 obtenido en el Ejemplo 2.

#### Ejemplo 5 Preparación de anticuerpo monoclonal quimérico de ser humano-ratón

El fragmento de amplificación génica que comprende el gen de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo # 1 o # 2 anti CAPRIN-1 obtenido en el Ejemplo 2, se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, después, se purificó y se insertó según un método habitual en un vector pcDNA4/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG<sub>1</sub> humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. Además, el fragmento de amplificación génica que comprende el gen de la región variable de la cadena ligera del anticuerpo # 1 anti CAPRIN-1, se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, después se purificó y se insertó según un método habitual en un vector pcDNA3.1/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía insertos génicos de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena L de IgG<sub>1</sub> humana que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

A continuación, el vector recombinante que tenía el inserto génico de la región variable de la cadena pesada del anticuerpo # 1 o # 2 anti CAPRIN-1 y el vector recombinante que tenía el inserto génico de la región variable de la cadena ligera, se introdujeron en células CHO-K1 (obtenidas en Riken Cell Bank). Específicamente, se cultivaron  $2 \times 10^5$  células CHO-K1 en 1 ml de un medio F12 de Ham (fabricado por Invitrogen Corp.) que contenía FBS al 10 % por pocillo de una placa de cultivo de 12 pocillos y se lavaron con PBS (-). Después, a esto, se añadió 1 ml de un medio F12 de Ham reciente que contenía FBS al 10 % por pocillo. se mezclaron 250 ng de cada uno de los vectores lisados en  $30 \mu\text{l}$  de OptiMEM (fabricado por Invitrogen Corp.) con  $30 \mu\text{l}$  de reactivo de transfección Polyfect (fabricado por Qiagen N.V.), y esta mezcla se añadió a cada pocillo. Las células CHO-K1 cotransfectadas con los vectores recombinantes se cultivaron en un medio F12 de Ham que contenía FBS al 10 % complementado con Zeocina  $200 \mu\text{g/ml}$  (fabricada por Invitrogen Corp.) y Geneticina  $200 \mu\text{g/ml}$  (fabricada por Roche Diagnostics KK) y después se inocularon a una placa de 96 pocillos a una densidad de 0,5 células/pocillo para preparar líneas celulares que produjeron de manera estable cualquiera de los anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón # 1 y # 2 que tenían las regiones variables de los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1, respectivamente, obtenidos en el Ejemplo 2.

Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de  $150 \text{ cm}^2$  a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían el anticuerpo monoclonal quimérico de ser humano-ratón #1 o # 2.

Además, se prepararon líneas celulares que producían, de manera estable, anticuerpos 1 a 26 comparativos quiméricos de ser humano-ratón como muestras comparativas de la misma manera que antes, respectivamente, utilizando los siguientes anticuerpos comparativos: anticuerpos monoclonales derivados de ratón anti CAPRIN-1 descritos en el documento WO2010/016526 [anticuerpos comparativos 1 a 11], anticuerpos monoclonales anti CAPRIN-1 descritos en el documento WO2011/096517 [un anticuerpo comparativo 12 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 (descrita en el mismo; lo mismo se aplica a la siguiente descripción) y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 47; y un anticuerpo comparativo 13 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 43], anticuerpos monoclonales anti CAPRIN-1 descritos en el documento WO2011/096528 [un anticuerpo comparativo 14 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 (descrita en el mismo; lo mismo se aplica a la siguiente descripción) y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 15 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 51 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 55; un anticuerpo comparativo 16 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 59 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 63; un anticuerpo comparativo 17 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 76 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 80; un anticuerpo comparativo 18 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 84 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 88; y un anticuerpo 19 comparativo que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 92 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 96], un anticuerpo monoclonal anti CAPRIN-1 descrito en el documento WO2011/096519 [un anticuerpo comparativo 20 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 42 (descrita en el mismo; lo mismo se aplica a la siguiente descripción) y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 46], anticuerpos monoclonales anti CAPRIN-1 descritos en el documento WO2011/096533 [un anticuerpo comparativo 21 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 (descrita en el mismo; lo mismo se aplica a la siguiente descripción) y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 51; un anticuerpo comparativo 22 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 47 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 23 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 63 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 67], y anticuerpos monoclonales anti CAPRIN-1 descritos en el documento WO2011/096534 [un anticuerpo comparativo 24 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 (descrita en el mismo; lo mismo se aplica a la siguiente descripción) y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 25 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 43 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 26 que tiene la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 63 y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 67]. Cada línea celular preparada, se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm<sup>2</sup> a una densidad de 5 x 10<sup>5</sup> células/ml, utilizando 30 ml de un medio OptiCHO sin suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener sobrenadantes de cultivo que contenían cualquiera de los anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos de ser humano-ratón 1 a 26.

Ejemplo 6 Expresión de CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas utilizando un anticuerpo monoclonal anti CAPRIN-1

A continuación, las 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V y MRK-nu-1), las 2 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1 y Caki-2), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), las 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), la línea celular de cáncer de próstata (PC3), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las 2 líneas celulares de tumor cerebral (T98G y U87MG), la línea celular de cáncer gástrico (MKN28), las 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1 y HCT-116) y las 4 líneas celulares de cáncer de páncreas (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1 y BxPC-3) en las que se confirmó que tenían expresión del gen CAPRIN-1, se examinaron con respecto a su expresión de proteínas CAPRIN-1 en la superficie celular utilizando los sobrenadantes del cultivo que contenían respectivamente los anticuerpos #1 y #2 anti CAPRIN-1 obtenidos en el Ejemplo 2. En cada tubo de microcentrifugadora de 1,5 ml se centrifugaron 10<sup>6</sup> células de cada línea celular. Cada sobrenadante de cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo, se añadió al tubo y se dejó reposar en hielo durante 1 hora. Después de lavar con PBS, se añadieron anticuerpos de cabra anti IgG (H+L) de ratón marcados con FITC (fabricados por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía FBS al 0,1 % y se dejaron reposar a 4 °C durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, utilizando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) se midió la intensidad de fluorescencia. El control negativo utilizado fue que las células reaccionaron solo con anticuerpos secundarios. Como resultado, cada uno de los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1, mostró reactividad con una intensidad de fluorescencia al menos 30 % más fuerte que la del control negativo. Esto demuestra que las proteínas CAPRIN-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de líneas de células de cáncer humanas. La tasa anterior de incremento de la intensidad de fluorescencia se indicó mediante la tasa de aumento de la intensidad de fluorescencia media (IFM) en cada línea celular y se calculó según la siguiente expresión:

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

Ejemplo 7 Actividad antitumoral contra células cancerosas de anticuerpos contra péptidos derivados de CAPRIN-1

(SEQ ID NO: 5)

Con el fin de evaluar cada anticuerpo contra el péptido derivado de CAPRIN-1 representado por la SEQ ID NO: 5 con respecto a la fuerza de su citotoxicidad contra células cancerosas que expresan CAPRIN-1, se determinó la actividad ADCC. En esta evaluación se utilizaron los anticuerpos policlonales contra el péptido representado por la SEQ ID NO: 5 preparados en el Ejemplo 3. Se llevó a cabo una evaluación similar utilizando anticuerpos policlonales contra otros péptidos derivados de CAPRIN-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos números 50 a 98 en la secuencia de aminoácidos de CAPRIN-1 humana y anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos números 233 a 305, que se prepararon en el Ejemplo 3) como anticuerpos para comparar y los anticuerpos de control derivados de suero de conejo preparados en el Ejemplo 3 como control negativo.

Se recogieron  $10^6$  células de cada una de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, la línea celular de cáncer de páncreas humano Capan-2 y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, en las que se confirmó que tenían expresión de CAPRIN-1, en un tubo de centrifugadora de 50 ml, al que después se añadieron 100  $\mu$ Ci de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía suero bovino fetal al 10 % y se añadieron a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/pocillo a cada placa con fondo en V de 96 pocillos. Los anticuerpos policlonales contra el péptido derivado de CAPRIN-1 humana representados por la SEQ ID NO: 5 y dos tipos de anticuerpos policlonales contra otros péptidos derivados de CAPRIN-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos números 50 a 98 en la SEQ ID NO: 2 de CAPRIN-1 humana y anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos números 233 a 305) como se describió anteriormente, se añadieron a estas por separado a una concentración de 1  $\mu$ g/pocillo. Adicionalmente, se añadieron a estas, linfocitos separados de sangre periférica humana o de conejo según un método habitual, a una densidad de  $4 \times 10^5$  células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, la cantidad de cromo (Cr) 51 liberada por las células cancerosas dañadas se midió en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad ADCC contra las células cancerosas de los anticuerpos policlonales contra cada péptido derivado de CAPRIN-1 humana. Como resultado, todos los anticuerpos policlonales obtenidos por inmunización con los péptidos parciales de CAPRIN-1 humana, que tienen una secuencia de aminoácidos de restos de aminoácidos números 50 a 98 o restos de aminoácidos números 233 a 305 de la SEQ ID NO: 2 de CAPRIN-1 humana, tuvieron una actividad menor del 8 % contra la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, la línea celular de cáncer de páncreas humano Capan-2 y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56. Por el contrario, se confirmó que los grupos complementados con los anticuerpos policlonales contra el péptido derivado de CAPRIN-1 humana representado por la SEQ ID NO: 5 tenían una actividad citotóxica del 27 % o superior contra todas las líneas de células de cáncer. Los anticuerpos de control negativo tenían una actividad menor del 5 % contra todas las células cancerosas. Estos resultados demostraron que el anticuerpo contra CAPRIN-1 mostrado en la SEQ ID NO: 5 ejerce una fuerte actividad citotóxica contra células cancerosas que expresan CAPRIN-1.

Estos resultados sobre la actividad citotóxica se obtuvieron: mezclando el anticuerpo contra CAPRIN-1 utilizado en la presente invención, linfocitos y  $2 \times 10^3$  células de cada línea de célula cancerosa con cromo 51 incorporado, como se describió anteriormente: cultivando las células durante 4 horas; después del cultivo, midiendo la cantidad de cromo 51 que se libera en el medio; y calculando la actividad citotóxica contra cada línea de célula cancerosa según la siguiente expresión\*:

\*Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 que se libera de las células diana complementadas con el anticuerpo contra CAPRIN-1 y linfocitos / Cantidad de cromo 51 que se libera de las células diana complementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100.

Los anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón # 1 y # 2 obtenidos en el Ejemplo 5 se evaluaron con respecto a su actividad citotóxica contra células cancerosas humanas. El sobrenadante de cultivo de cada línea celular que produce cualquiera de los anticuerpos, se purificó utilizando Hitrap Protein A Sepharose FF (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Después del reemplazo con PBS(-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu$ m (fabricado por Millipore Corp.). El anticuerpo resultante se utilizó para el ensayo de actividad. Se recogieron  $10^6$  células de cada una de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, la línea celular de cáncer de páncreas humano Capan-2 y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56, en un tubo de centrifugadora de 50 ml, al que después se añadieron 100  $\mu$ Ci de cromo 51, seguido de incubación a 37 °C durante 2 horas. Después, para preparar células diana, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía FBS al 10% y se añadieron a una densidad de  $2 \times 10^3$  células/pocillo a cada placa con fondo en V de 96 pocillos. Cada uno de los anticuerpos purificados (anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón #1 y #2) y los anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos de ser humano-ratón 1 a 26 obtenidos en el Ejemplo 5, se añadieron a estas a una concentración de 0,75  $\mu$ g/pocillo. Utilizando un método habitual, una población de células que contenía células NK humanas se separó de linfocitos de sangre periférica humana preparados según un método habitual. La población celular que contenía células NK humanas que se utilizó en esta evaluación se preparó de la siguiente manera: células mononucleares de sangre periférica humana 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 los siguientes anticuerpos marcados con colorante (anticuerpo anti CD3 humano, anticuerpo anti CD20 humano, anticuerpo anti CD19 humano,

anticuerpo anti CD11c humano, o anticuerpo anti HLA-DR (Becton, y Dickinson and Company)), y una población celular que contenía células NK no teñidas con los anticuerpos se separó utilizando un clasificador de células (FACS Vantage SE (Becton y Dickinson y Company)) o un kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec KK). La población celular separada que contenía células NK se añadió a la placa a una densidad de  $2 \times 10^5$  células/pocillo y se cultivaron a 37 °C durante 4 horas con CO<sub>2</sub> al 5 %. Después del cultivo, para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti CAPRIN-1 contra las células cancerosas, se midió la cantidad de cromo 51 que se libera de las células tumorales dañadas en el sobrenadante del cultivo. El control negativo utilizado fue células complementadas con anticuerpos de control de isotipo. Como resultado, los anticuerpos de control de isotipo utilizados tenían una actividad citotóxica menor de 5 % contra todas las líneas de células cancerosas, y los anticuerpos monoclonales comparativos quiméricos de ser humano-ratón 1 a 26 utilizados tenían una actividad citotóxica menor de 5 % contra MDA-MB-231V, menor de 8 % contra DLD-1, menor de 6 % contra Capan-2 y menor de 6 % contra QG56. Por el contrario, el anticuerpo anti CAPRIN-1 quimérico de ser humano-ratón # 1, tenía una actividad citotóxica de 15 % o mayor contra MDA-MB-231V, de 24 % o mayor contra DLD-1, de 26 % o mayor contra Capan-2 y de 19 % o mayor contra QG56. Del mismo modo, los anticuerpos de control de isotipo utilizados y los anticuerpos comparativos 1 a 26 utilizados tenían una actividad citotóxica menor de 4 % contra todas las demás células cancerosas, líneas celulares de cáncer de mama T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MCF7, y MRK-nu-1, una línea celular de glioma T98G, una línea celular de cáncer de pulmón A549, una línea celular de cáncer de riñón Caki-1, una línea celular de cáncer de cuello uterino SW756, una línea celular de cáncer de vejiga urinaria T24, una línea celular de cáncer gástrico MKN28, una línea celular de cáncer de intestino grueso SW480, una línea celular de leucemia AML5 y una línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, se confirmó que los anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón # 1 y # 2 tenían una actividad citotóxica del 10 % o mayor contra estas líneas celulares. Estos resultados mostraron que los anticuerpos contra el péptido derivado de CAPRIN-1 mostrado en la SEQ ID NO: 5 dañan las células cancerosas que expresan CAPRIN-1 a través de su actividad ADCC, y demostraron que los anticuerpos monoclonales quiméricos de ser humano-ratón # 1 y # 2 exhiben actividad citotóxica más fuerte contra células cancerosas humanas que la de los anticuerpos comparativos 1 a 26.

Estos resultados sobre la actividad citotóxica se obtuvieron: mezclando el anticuerpo contra CAPRIN-1 utilizado en la presente invención, linfocitos (una población celular que contenía células NK) y  $2 \times 10^3$  células de cada línea de célula cancerosa con cromo 51 incorporado, como se describió anteriormente: cultivando las células durante 4 horas; después del cultivo, midiendo la cantidad de cromo 51 que se libera en el medio; y calculando la actividad citotóxica contra cada línea de célula cancerosa según la siguiente expresión\*:

\*Expresión: Actividad citotóxica (%) = Cantidad de cromo 51 que se libera de las células diana complementadas con el anticuerpo contra CAPRIN-1 y linfocitos (una población celular que contenía células NK)/Cantidad de cromo 51 que se libera de las células diana complementadas con ácido clorhídrico 1 N x 100.

Ejemplo 8 El número de moléculas CAPRIN-1 en la superficie de varias células cancerosas reconocidas por los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1

Utilizando un kit de ensayo "QIFIKIT" (fabricado por Dako Japan Inc.), se examinó una línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231V), una línea celular de cáncer de riñón (Caki-1), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer de ovario (SKOV3), líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56) y A549), una línea celular de cáncer de páncreas (Capan-2), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), una línea celular de tumor cerebral (T98G), una línea celular de cáncer gástrico (MKN28), líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo y DLD-1), una línea celular de leucemia (AML5) y una línea celular de linfoma (Ramos), para determinar el número de moléculas CAPRIN-1 en su superficie celular reconocidas por los anticuerpos # 1 y # 2 anti CAPRIN-1. De manera similar, utilizando los anticuerpos monoclonales comparativos anti CAPRIN-1 1 a 26 preparados en el Ejemplo 5, también se examinó el número de moléculas CAPRIN-1 en la superficie de estas diversas células cancerosas.

Según el protocolo adjunto al kit, cada anticuerpo (anticuerpos # 1 y anticuerpos comparativos 1 a 26 anti CAPRIN-1) se diluyó en 5 µg/ml (en cuanto a concentración final) con PBS, y esta dilución se añadió a cada línea celular y se hizo reaccionar durante 30 minutos. Después de lavar con PBS, como anticuerpos secundarios, a cada línea celular se añadieron anticuerpos anti IgG de ratón marcados con fluorescencia adjuntos al kit, junto con perlas de calibración adjuntas al kit y de dejó en reposo en hielo durante 45 minutos. Cada línea celular y las perlas de calibración se lavaron con PBS. Después, utilizando FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company) se midió la intensidad de fluorescencia para obtener un valor (medio) de intensidad de fluorescencia media. Además, se obtuvo un valor (medio) de intensidad de fluorescencia media mediante el mismo ensayo que el anterior para los anticuerpos comparativos. El control negativo utilizado fueron las células que reaccionaron con los anticuerpos de control de isotipo, y también se obtuvo una media. Cada valor (medio) de intensidad de fluorescencia media se utilizó para calcular el número de moléculas según el protocolo adjunto al kit. Como resultado, el número de moléculas CAPRIN-1 en la superficie de varias células de cáncer reconocidas por los anticuerpos monoclonales # 1 y # 2 anti CAPRIN-1 y los anticuerpos comparativos 12 a 26 fue de  $10^5$  o mayor por célula para todas las líneas de células de cáncer humanas examinadas. Por otro lado, el número de moléculas reconocidas por los anticuerpos comparativos 1 a 11 fue menor que  $10^5$  por célula.

#### Aplicabilidad industrial

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

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Toray Industries, Inc.  
<120> Composición farmacéutica para el tratamiento y la prevención de cáncer
- 10 <130> PH-5511-PCT  
<150> JP 2012-035491  
<151> 21-02-2012
- 15 <160> 27  
<170> PatentIn versión 3.1
- 20 <210> 1  
<211> 5562  
<212> ADN  
<213> Homo sapiens
- 25 <220>  
<221> CDS  
<222> (190)..(2319)  
<223>
- 30 <400> 1

ES 2 739 380 T3

cagagggctg ctggctggct aagtcctcc cgctcccggc tctcgctca ctaggagcgg	60
ctctcggcgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc	120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgatttcag cggcctccgc	180
gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg	231
Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser	
1 5 10	
tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg	279
Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala	
15 20 25 30	
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc	327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr	
35 40 45	
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac	375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp	
50 55 60	
aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac	423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr	
65 70 75	
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat	471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp	
80 85 90	
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa	519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys	
95 100 105 110	
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca	567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr	
115 120 125	

ES 2 739 380 T3

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

ES 2 739 380 T3

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

ES 2 739 380 T3

Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly	
625	630
tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct	2151
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser	
640	645
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
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
cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa	2295
Pro Arg Gly Arg Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln	
690	695
700	
atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca	2349
Met Asn Thr Gln Gln Val Asn	
705	
aaaacacact ggccagtgt ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttgttct	2409
ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat	2469
tgctcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactatgt ttactctgca tgttctgtcc	2529
taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctcagattcc tcacccttgc ttaggagtaa	2589
aacaatatac tttacaggtg gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag	2649
gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctcga gttattcaat	2709
gataactgac aaactaaatt atttccctag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtggtt	2769
tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acggttcagat	2829
gcataccaaa ttatgcatgg gtcctaatac cacatataag gctggctacc agctttgaca	2889
cagcactggt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac	2949
agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaaattag gctttgattg gcactttttg	3009
aaaaatatgc aacaaatag ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa	3069
tatttagata cttttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat	3129
tggctactatc tatcattcct tatgacatgt acattgtctg tcactaatcc ttggattttg	3189
ctgtattgtc acctaaattg gtacaggtac tgatgaaaat ctctagtgga taatcataac	3249
actctcggtc acatgttttt ccttcagctt gaaagctttt ttttaaaagg aaaagatacc	3309
aaatgcctgc tgctaccacc cttttcaatt gctatctttt gaaaggcacc agtatgtgtt	3369
ttagattgat ttccctgttt cagggaaatc acggacagta gtttcagttc tgatggata	3429
agcaaaacaa ataaaacgtt tataaaagtt gtatcttgaa aactggtgt tcaacagcta	3489
gcagcttatg tgattcacc ccatgccacgt tagtgtcaca aattttatgg tttatctcca	3549

ES 2 739 380 T3

gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609  
ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc cttcccttag atgcataggg 3669  
agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729  
ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789  
tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849  
taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattcctt 3909  
ccagtaggtg ctacgctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969  
tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctggtgaac attccacatt 4029  
caaaagtttt gtaggggtgt gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089  
aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtggtac atcatattgg aagggttaac 4149  
ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgctg ctttaaatga 4209  
catctgcctg ggatgtacca caaccatag ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat 4269  
atgtgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329  
atgtgctatc tgtgtagaaa ataatttcat gacatttaca atcaggactg aagtaagttc 4389  
ttcacacagt gacctctgaa tcagtttcag agaagggatg ggggagaaaa tgccttctag 4449  
gttttgaact tctatgcatt agtgcagatg ttgtgaatgt gtaaaggtgt tcatagtttg 4509  
actgtttcta tgtatgtttt ttcaaagaat tgttcctttt tttgaactat aatttttctt 4569  
tttttggtta ttttaccatc acagtttaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629  
tatttttaa 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 tttttaaacc ttaaaaaggt agaatgttat 4929  
tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989  
aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049  
atcagttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109  
tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaaggttcat taactgaggt 5169  
gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttcctaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229  
atattttocg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289  
tcattttatg ttttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa 5349  
attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagat tgcccttgat cttgtccttt 5409  
ttatggagtt aacgggggag aagaccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469  
  
tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatggt 5529  
taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

ES 2 739 380 T3

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

5

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 739 380 T3

His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu Lys Pro  
 210 215 220

Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu Arg Val  
 225 230 235 240

Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn Gly Leu  
 245 250 255

Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp Gln Val  
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu Pro Ile



ES 2 739 380 T3

Thr Gln Gln Val Asn  
705

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

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

<400> 3

```

cagagggctg ctggctggct aagtccctcc cgctcccggc tctgcctca ctaggagcgg      60
ctctcgggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc      120
ggaagggacc gccacccttg cccctcagc tgcccactcg tgatttcag cggcctccgc      180
gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg      231
      Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
      1           5           10
tcc gga ccg cca ccg ccg tcg ggt tcc tcc ggg agt gag gcg gcc gcg      279
Ser Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala
15           20           25           30
gga gcc ggg gcc gcc gcg ccg gct tct cag cac ccc gca acc ggc acc      327
Gly Ala Gly Ala Ala Ala Pro Ala Ser Gln His Pro Ala Thr Gly Thr
35           40           45
ggc gct gtc cag acc gag gcc atg aag cag att ctc ggg gtg atc gac      375
Gly Ala Val Gln Thr Glu Ala Met Lys Gln Ile Leu Gly Val Ile Asp
50           55           60
aag aaa ctt cgg aac ctg gag aag aaa aag ggt aag ctt gat gat tac      423
Lys Lys Leu Arg Asn Leu Glu Lys Lys Lys Gly Lys Leu Asp Asp Tyr
65           70           75
cag gaa cga atg aac aaa ggg gaa agg ctt aat caa gat cag ctg gat      471
Gln Glu Arg Met Asn Lys Gly Glu Arg Leu Asn Gln Asp Gln Leu Asp
80           85           90
gcc gtt tct aag tac cag gaa gtc aca aat aat ttg gag ttt gca aaa      519
Ala Val Ser Lys Tyr Gln Glu Val Thr Asn Asn Leu Glu Phe Ala Lys
95           100          105          110
gaa tta cag agg agt ttc atg gca cta agt caa gat att cag aaa aca      567
Glu Leu Gln Arg Ser Phe Met Ala Leu Ser Gln Asp Ile Gln Lys Thr
115          120          125
ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa      615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu
130          135          140
cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa      663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys
145          150          155
ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga      711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly

```

15

ES 2 739 380 T3

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

ES 2 739 380 T3

Ser	Arg	Leu	Ala	Gln	Pro	Asn	Gln	Val	Pro	Val	Gln	Pro	Glu	Ala	Thr		
415					420					425					430		
cag	ggt	cct	ttg	gta	tca	tcc	aca	agt	gag	ggg	tac	aca	gca	tct	caa		1527
Gln	Val	Pro	Leu	Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Glu	Gly	Tyr	Thr	Ala	Ser	Gln		
				435					440					445			
ccc	ttg	tac	cag	cct	tct	cat	gct	aca	gag	caa	cga	cca	cag	aag	gaa		1575
Pro	Leu	Tyr	Gln	Pro	Ser	His	Ala	Thr	Glu	Gln	Arg	Pro	Gln	Lys	Glu		
			450					455					460				
cca	att	gat	cag	att	cag	gca	aca	atc	tct	tta	aat	aca	gac	cag	act		1623
Pro	Ile	Asp	Gln	Ile	Gln	Ala	Thr	Ile	Ser	Leu	Asn	Thr	Asp	Gln	Thr		
		465					470					475					
aca	gca	tca	tca	tcc	ctt	cct	gct	gcg	tct	cag	cct	caa	gta	ttt	cag		1671
Thr	Ala	Ser	Ser	Ser	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Gln	Pro	Gln	Val	Phe	Gln		
	480					485					490						
gct	ggg	aca	agc	aaa	cct	tta	cat	agc	agt	gga	atc	aat	gta	aat	gca		1719
Ala	Gly	Thr	Ser	Lys	Pro	Leu	His	Ser	Ser	Gly	Ile	Asn	Val	Asn	Ala		
495					500					505					510		
gct	cca	ttc	caa	tcc	atg	caa	acg	gtg	ttc	aat	atg	aat	gcc	cca	gtt		1767
Ala	Pro	Phe	Gln	Ser	Met	Gln	Thr	Val	Phe	Asn	Met	Asn	Ala	Pro	Val		
				515					520					525			
cct	cct	ggt	aat	gaa	cca	gaa	act	tta	aaa	cag	caa	aat	cag	tac	cag		1815
Pro	Pro	Val	Asn	Glu	Pro	Glu	Thr	Leu	Lys	Gln	Gln	Asn	Gln	Tyr	Gln		
			530					535					540				
gcc	agt	tat	aac	cag	agc	ttt	tct	agt	cag	cct	cac	caa	gta	gaa	caa		1863
Ala	Ser	Tyr	Asn	Gln	Ser	Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	His	Gln	Val	Glu	Gln		
		545					550					555					
aca	gag	ctt	cag	caa	gaa	cag	ctt	caa	aca	gtg	ggt	ggc	act	tac	cat		1911
Thr	Glu	Leu	Gln	Gln	Glu	Gln	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Gly	Thr	Tyr	His		
	560					565					570						
ggt	tcc	cca	gac	cag	tcc	cat	caa	gtg	act	ggt	aac	cac	cag	cag	cct		1959
Gly	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	His	Gln	Val	Thr	Gly	Asn	His	Gln	Gln	Pro		
575					580					585					590		
cct	cag	cag	aac	act	gga	ttt	cca	cgt	agc	aat	cag	ccc	tat	tac	aat		2007
Pro	Gln	Gln	Asn	Thr	Gly	Phe	Pro	Arg	Ser	Asn	Gln	Pro	Tyr	Tyr	Asn		
				595				600					605				
agt	cgt	ggt	gtg	tct	cgt	gga	ggc	tcc	cgt	ggt	gct	aga	ggc	ttg	atg		2055
Ser	Arg	Gly	Val	Ser	Arg	Gly	Gly	Ser	Arg	Gly	Ala	Arg	Gly	Leu	Met		
			610					615					620				
aat	gga	tac	cgg	ggc	cct	gcc	aat	gga	ttc	aga	gga	gga	tat	gat	ggt		2103
Asn	Gly	Tyr	Arg	Gly	Pro	Ala	Asn	Gly	Phe	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Gly		
		625					630					635					
tac	cgc	cct	tca	ttc	tct	aac	act	cca	aac	agt	ggt	tat	aca	cag	tct		2151
Tyr	Arg	Pro	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Pro	Asn	Ser	Gly	Tyr	Thr	Gln	Ser		
		640					645				650						
cag	ttc	agt	gct	ccc	cgg	gat	tac	tct	ggc	tat	caa	cgg	gat	gga	tat		2199
Gln	Phe	Ser	Ala	Pro	Arg	Asp	Tyr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Arg	Asp	Gly	Tyr		
655					660					665					670		





ES 2 739 380 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 739 380 T3

Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln Ala Ser  
 530 535 540

Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln Thr Glu  
 545 550 555 560

Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His Gly Ser  
 565 570 575

Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro Pro Gln  
 580 585 590

Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn Ser Arg  
 595 600 605

Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met Asn Gly  
 610 615 620

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

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

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

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

Gly Asn Ile Leu Trp Trp  
 690

<210> 5  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro  
 1 5 10 15

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

<400> 6

ES 2 739 380 T3

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

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser  
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr  
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys  
 85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220

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

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

ES 2 739 380 T3

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

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

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

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

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

<210> 7  
 <211> 106  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 7

5

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

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

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

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

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

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

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

10

<210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 8

15

ES 2 739 380 T3

Thr Asn Ala Met Asn  
1 5

5  
<210> 9  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 9

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

10  
Val

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

20  
Asp Trp Asp Gly Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp  
1 5 10

25  
<210> 11  
<211> 112  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*  
  
<400> 11

ES 2 739 380 T3

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

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

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

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

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

Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Arg Asp Trp Asp  
 85 90 95

Gly Phe Leu Tyr Phe Asp Tyr Trp Ala Lys His His Leu Thr Leu Phe  
 100 105 110

5 <210> 12  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 12

10 Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Asn Gln Gln  
 1 5 10 15

15 <210> 13  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 13

20 Leu Val Ser Asn Leu Glu Ser  
 1 5

<210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

25 <400> 14

30 Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg Ser  
 1 5

<210> 15  
 <211> 104

ES 2 739 380 T3

<212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

<400> 15

5

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

Ile Ser Tyr Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

Met His Trp Asn Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Arg Leu Leu Ile  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ile Arg Glu Leu Thr Arg

85

90

95

Ser Glu Gly Gly Pro Ser Trp Lys  
 100

<210> 16  
 <211> 336  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

10

<400> 16

15

ggtggaggat tgggtgcagcc taaaggggtca ttgaaactct catgtgcagc ctctggattc 60  
 accttcaata ccaatgccat gaactggggtc cgccaggctc caggaaaggg tttggaatgg 120  
 gttgctcgca taagaagtaa aagtaataat tatgcaacat attatgccga ttcagtgaaa 180  
 gacagggttca ccatctccag agatgattca caaagcatgc tctatctgca aatgaacaac 240  
 ttgaaaactg aggacacagc catgtattac tgtgtgagag attgggatgg tttcctttac 300  
 tttgactact gggccaagca ccacttgacg ctattc 336

<210> 17  
 <211> 312  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

20

<400> 17

ES 2 739 380 T3

acacagtctc ctgcttcctt agctgtatct ctggggcaga gggccacat ctcatacagg 60  
 gccagcaaaa gtgtcagtac atctggctat agttatatgc actggaacca acagaaacca 120  
 ggacagccac ccagactcct catctatctt gtatccaacc tagaatctgg ggtccctgcc 180  
 aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcaccctca acatccatcc tgtggaggag 240  
 gaggatgctg caacctatta ctgtcagcac attagggagc ttacacgttc ggagggggga 300  
 ccaagctgga aa 312

5 <210> 18  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 18

10 Ser Tyr Trp Met His  
 1 5

15 <210> 19  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 <400> 19

Met Ile Asp Pro Ser Asp Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys  
 1 5 10 15

Asp

20 <210> 20  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 25 <400> 20

Tyr Pro Asp Trp Ala Lys Ala His Ser Pro Leu  
 1 5 10

30 <210> 21  
 <211> 103  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*  
 35 <400> 21

ES 2 739 380 T3

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

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

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Met Ile Asp Pro Ser Asp  
35 40 45

Ser Glu Thr Arg Leu Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr  
50 55 60

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

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Pro Asp Trp Ala  
85 90 95

Lys Ala His Ser Pro Leu Arg  
100

5 <210> 22  
<211> 15  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 22

10 Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Leu Gln  
1 5 10 15

15 <210> 23  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

<400> 23

20 Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

25 <400> 24

30 Gln Gln Leu Val Glu Asp Pro Leu Thr  
1 5

<210> 25

ES 2 739 380 T3

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

5 <400> 25

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

Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr  
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Val Glu Asp Pro Leu  
 85 90 95

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

10 <210> 26  
 <211> 309  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

15 <400> 26

gggcctcagc tggtaggcc tggggcttca gtgaagatat cctgcaaggc ttctggttac 60  
 tcattcacca gctactggat gcaactgggtg aagcagagggc ctggacaagg tcttgagtgg 120  
 attggcatga ttgatccttc cgatagttaa actagggttaa atcagaagtt caaggacaag 180  
 gccacattga ctgtagacaa atcctccagc acagcctaca tgcaactcag cagcccgaca 240  
 tctgaggact ctgcgggtcta ttactgtgca acctaccggg actgggcca ggcacactct 300  
 ccattacgt 309

20 <210> 27  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> *Mus musculus*

<400> 27

## ES 2 739 380 T3

caggatgaac tctccaatcc tgtcacttct ggagaatcag tttccatctc ctgcaggtct	60
agtaagagtc tcctatataa ggatgggaag acatatttga attggtttct gcagagacca	120
ggacaatctc ctcagctcct gatctatttg atgtccaccc gtgcatcagg agtctcagac	180
cggtttagtg gcagtgggtc aggaacagat ttcaccctgg aaatcagtag agtgaaggct	240
gaggatgtgg gtgtgtatta ctgtcaacaa cttgtagagg atccgctcac gttcggtgct	300
ggaccaagc tggagctgaa acgg	324

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un anticuerpo, o un fragmento del mismo, que se une a un polipéptido parcial de CAPRIN-1 que consta de la secuencia de aminoácidos Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val Pro Pro (SEQ ID NO: 5).
2. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según la reivindicación 1, en donde el anticuerpo, o el fragmento del mismo, tiene actividad citotóxica contra una célula cancerosa que expresa una proteína CAPRIN-1.
- 10 3. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.
- 15 4. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monocatenario o un anticuerpo multiespecífico.
- 20 5. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo, o el fragmento del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10 (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14 (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente) y se une a la proteína CAPRIN-1.
- 25 6. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo, o el fragmento del mismo, comprende una región variable de cadena pesada que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 18, 19 y 20 (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente) y una región variable de cadena ligera que comprende regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 22, 23 y 24 (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente) y se une a la proteína CAPRIN-1.
- 30 7. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo, o el fragmento del mismo, se conjuga con un agente antitumoral.
- 35 8. Una composición farmacéutica, que comprende, como principio activo, un anticuerpo, o un fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.
- 40 9. Un fármaco de combinación que comprende una composición farmacéutica según la reivindicación 8 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.
- 45 10. El anticuerpo, o el fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o la composición farmacéutica según la reivindicación 8, o el fármaco de combinación según la reivindicación 9, para su uso en un método de tratamiento de cáncer.
11. El anticuerpo o el fragmento, la composición farmacéutica, o el fármaco de combinación, para su uso en un método de tratamiento de cáncer según la reivindicación 10, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer de páncreas, cáncer de intestino grueso, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de esófago, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.
12. Un ADN que codifica un anticuerpo, o un fragmento del mismo, según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.