(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 749 672**

(51) Int. CI.:

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)
C07K 16/18 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.02.2013 PCT/JP2013/054312**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **29.08.2013 WO13125630**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.02.2013 E 13751159 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2818481**

(54) Título: **Composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el cáncer**

(30) Prioridad:

21.02.2012 JP 2012035342

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.03.2020

(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

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

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 tratar y/o prevenir el cáncer

Campo de la técnica

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

Técnica antecedente

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

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

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

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

Listado de referencias

Bibliografía de Patente

Bibliografía de Patente 1: Patente de EE. UU. Nº 5698396

Bibliografía de Patente 2: Patente WO2010/016526

Bibliografía no Patente

Bibliografía no Patente 1: Tsuyoshi Akiyoshi, "Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy", 1997, Vol. 24, p. 55-519 (Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., Japón)
Bibliografía no Patente 2: Bruggen P. et al., Science, 254: 1643-1647 (1991)
Bibliografía no Patente 3: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92: 11810-11813 (1995)
Bibliografía no Patente 4: Int. J. Cancer, 72: 965-971 (1997)

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

Sumario de la invención

Problema técnico

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

Solución del problema

Las características de la presente invención son las siguientes:

La presente invención proporciona un anticuerpo o un fragmento del mismo tal como se define en las reivindicaciones, un polipéptido de CAPRINA-1 parcial que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEQ ID NO: 5.
Los aspectos y realizaciones adicionales de la invención, incluyendo los medios para su uso en el tratamiento y/o prevención el cáncer, se definen en las reivindicaciones.

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

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

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

Efectos ventajosos de la invención

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

Descripción de las realizaciones

El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido parcial de CAPRINA-1 predeterminado y tiene actividad antitumoral. Más específicamente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención es un anticuerpo que se une un polipéptido parcial de una proteína CAPRINA-1 (polipéptido parcial de CAPRINA-1) que consiste en la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 5.
En la presente divulgación, este anticuerpo ha demostrado que presenta actividad antitumoral. La presente invención se refiere a todos los anticuerpos que se unen a los fragmentos de prote´nas de CAPRINA-1 tal como se definen en las reivindicaciones y que presentan actividad antitumoral.

El anticuerpo contra CAPRINA-1 de acuerdo con la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo que pueda ejercer una actividad antitumoral e incluye, por ejemplo, anticuerpos recombinantes (por ejemplo, anticuerpos sintéticos, anticuerpo multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos), anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y anticuerpos de cadena sencilla (scFv)), anticuerpos humanos, y sus fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, y Fv). Estos anticuerpos y los fragmentos de los mismos se pueden preparar por métodos conocidos por los expertos en la técnica. Preferentemente, el anticuerpo de acuerdo con la presente invención se une específicamente a la proteína CAPRINA-1. En este contexto, la frase “que se une específicamente a la proteína CAPRINA-1” significa que el anticuerpo se une específicamente a la proteína CAPRINA-1 sin unirse sustancialmente a otras proteínas. El anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente un anticuerpo monoclonal y sin embargo, puede ser un anticuerpo policlonal siempre que se produzcan anticuerpos homogéneos establemente. En el caso de un sujeto humano, es deseable un anticuerpo humano o un anticuerpo humanizado para evitar o suprimir el rechazo.

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

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

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

< Preparación del antígeno para la preparación de anticuerpos >

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

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

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

Como fragmento de proteína CAPRINA-1, un fragmento que comprende un epítopo (o un determinante antigénico), que es la unidad más pequeña reconocida por un anticuerpo, y que tenga una longitud que varía desde la longitud de aminoácidos del epítopo a menos de la longitud completa de la proteína CAPRINA-1 se puede utilizar. El epítopo se refiere a un fragmento polipeptídico que tiene antigenicidad o inmunogenicidad en mamíferos, preferentemente seres humanos. Su unidad más pequeña consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos, por ejemplo 8 a 11 aminoácidos. El fragmento de proteína CAPRINA-1 para su uso en la preparación del anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente un fragmento que es reconocido por el anticuerpo de la presente invención y comprende la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 (que se corresponde con la secuencia desde la posición 237 a 252 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4) o una secuencia de aminoácidos que tiene un 80 % o mayor, preferentemente un 85 % o mayor, más preferentemente un 90 % o mayor, más preferentemente un 95 % o mayor de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos, o comprende al menos un epítopo que consiste en aproximadamente 7 a 12 aminoácidos consecutivos, por ejemplo 8 a 11 aminoácidos consecutivos en cualquiera de estas secuencias de aminoácidos.

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

De manera alternativa, los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar utilizando estrategias de modificación genéticas conocidas en la técnica (Sambrook et al., Molecular Cloning, the 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, the 3ª edición, A compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons; etc.) y que se incorporan en vectores de expresión, que se introducen entonces en células huésped para producir los polipéptidos en las células huésped. De esta manera, se pueden obtener las proteínas de CAPRINA-1 humana o los fragmentos polipeptídicos de interés de la misma.

Los polinucleótidos que codifican los polipéptidos se pueden preparar fácilmente por estrategias de modificación genética conocidas en la técnica o métodos convencionales utilizando sintetizadores de ácidos nucleico disponibles

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

También, se pueden preparar sondas apropiadas basándose en la información sobre las secuencias de nucleótidos de los genes de CAPRINA-1 y las secuencias de aminoácidos de las proteínas CAPRINA-1, y utilizarse para la exploración, por ejemplo, en una biblioteca de ADNc humano, para aislar el ADN deseado. Preferentemente, dicha biblioteca de ADNc se produce a partir de células, órganos, o tejidos que expresan proteínas CAPRINA-1. Ejemplos de dichas células o tejidos incluyen células o tejidos derivados de los testículos o de cánceres o tumores tales como leucemia, cáncer de mama, linfoma, tumor cerebral, cáncer de pulmón, cáncer pancreático, y cáncer colorrectal. Estas operaciones, incluyendo la preparación de sondas o cebadores, la construcción de una biblioteca de ADNc, la exploración en la biblioteca de ADNc, y la clonación del gen de interés, son conocidas por los expertos en la técnica y se pueden llevar a cabo de acuerdo con los métodos descritos, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning, la 2ª edición, Current Protocols in Molecular Biology (1989), y Ausubel et al. (ibid.). Los ADN que codifican las proteínas CAPRINA-1 humana y los péptidos parciales de las mismas se pueden obtener a partir del ADN así obtenido.

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

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

En el caso de utilizar las células eucariotas como células huésped, se utilizan vectores de expresión para células eucariotas que tienen un promotor, una región de corte y empalme, un sitio de adición poli(A), etc. como vectores de expresión. Ejemplos de dichos vectores de expresión pueden incluir vectores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3, y pYES2. De la misma manera anterior, los ADN que codifican los polipéptidos anteriores se pueden incorporar en dichos vectores de expresión con los que se transforman entonces las células huésped eucariotas, seguido por el cultivo de los transformantes obtenidos de manera que los polipéptidos codificados por los ADN se expresan en las células huésped eucariotas. En el caso de utilizar vectores de expresión tales como pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, o pEGFP-C1, los polipéptidos se pueden expresar como distintas proteínas de fusión marcadas con un marcador His (por ejemplo, $(His)_6$ to $(His)_{10}$),, marcador FLAG, marcador myc, marcador HA, o similares.

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

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

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

< Estructura del anticuerpo >

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

< Preparación del anticuerpo >

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

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

El anticuerpo de la presente invención puede ser cualquier tipo de anticuerpo. Ejemplos de los tipos de anticuerpo de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos sintéticos, anticuerpos multiespecíficos, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$ y Fv). También, el anticuerpo es cualquier clase de molécula de inmunoglobulina, por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgA, IgD, o IgY, o cualquier subclase, por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, o IgA2.

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

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

Cuando el anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, se administra una línea celular de cáncer de mama SK-BR-3 que expresa CAPRINA-1 a cada ratón para la inmunización. Se extrae el bazo de los ratones. Tras la separación de las células esplénicas, las células se fusionan con células de mieloma de ratón. Los clones que producen anticuerpos que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de las células del cáncer

se seleccionan de entre las células de fusión obtenidas (hibridoma). De manera alternativa, se pueden seleccionar los clones que producen anticuerpo se unen a un polipéptido que consiste en la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5 o un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene el 80 % o más de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos. Los hibridomas que producen los anticuerpos monoclonales que tienen un efecto inhibidor del crecimiento de células cancerosas o los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales contra el péptido de SEQ ID NO: 5 o similares se aíslan y cultivan. El anticuerpo de la presente invención se puede preparar por purificación del sobrenadante del cultivo de acuerdo con un método de purificación por afinidad general.

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

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

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

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

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

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

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

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

Además de dicha obtención de los hibridomas mediante la inmunización de animales no humanos con antígenos, los hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen la actividad deseada (por ejemplo, actividad inhibidora del crecimiento celular) se pueden obtener por sensibilización de linfocitos humanos, por ejemplo, linfocitos humanos infectados con virus EB, con proteínas, células que expresan proteínas, o lisados de las mismas in vitro y fusionar los linfocitos sensibilizados con células de mieloma derivadas de seres humanos capaces de dividirse permanentemente, por ejemplo, U266 (Nº de registro TIB 196).

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

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

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

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

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

Los antígenos se pueden preparar de acuerdo, por ejemplo, con un método que utilice células animales (Publicación de Patente JP (Kohyo) No. 2007-530068 A) o un método que utilice baculovirus (por ejemplo, la Publicación Internacional Nº W098/46777). Los antígenos que tienen una inmunogenicidad baja se pueden unir a macromoléculas inmunogénicas tales como la albúmina para la inmunización. Los antígenos se pueden administrar junto con adyuvantes para la inmunización.

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede obtener como un anticuerpo recombinante genéticamente que se produce utilizando una técnica de ingeniería genética que implica: clonar genes de anticuerpo a partir de hibridomas; incorporar los genes de anticuerpo en vectores apropiados; e introducir los vectores en huéspedes (véase, por ejemplo, Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Específicamente, los ADNc de la región variable (región V) del anticuerpo se sintetizan a partir de los ARNm de los hibridomas utilizando una transcriptasa inversa. Tras la obtención de los ADN que codifican las regiones V de interés, se ligan los ADN con los ADN que codifican las regiones constantes (regiones C) de anticuerpo deseadas. Los productos de la unión resultantes se incorporan en vectores de expresión. De manera alternativa, los ADN que codifican la región V de anticuerpo se pueden incorporar en vectores de expresión que contienen los ADN de la región C de anticuerpo. Estos ADN se incorporan en los vectores de expresión de manera que se expresen bajo el control de expresión de regiones de control, por ejemplo, un amplificador y un promotor. Después, se pueden transformar las células huésped con los vectores de expresión resultantes y se permite que se expresen los anticuerpos.

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

El anticuerpo monoclonal incluye anticuerpos monoclonales humanos, anticuerpos monoclonales de animales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales de ratón, rata, conejo, y pollo), anticuerpos monoclonales quiméricos y similares. El anticuerpo monoclonal se puede preparar por el cultivo de hibridomas obtenidos por la

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

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

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

Específicamente, por ejemplo, las secuencias de ADN diseñadas para unirse con las CDR de anticuerpos de ratón, conejo o pollo, y las regiones marco conservadas humanas (FR) se sintetizan por PCR utilizando varios oligonucleótidos preparados que tienen partes terminales solapadas entre ellas. Los ADN obtenidos se unen con ADN que codifican regiones constantes de anticuerpos humanos. Posteriormente, los productos de unión resultantes se incorporan en vectores de expresión que se introducen entonces en huéspedes para la producción de anticuerpo para obtener el anticuerpo de interés (véase la Publicación de Solicitud de Patente europea Nº EP239400 y la Publicación Internacional Nº WO96/02576).
Las FR de anticuerpo humano conectadas mediante las CDR se seleccionan de manera que las regiones determinantes de complementariedad formen un sitio de unión al antígeno favorable. Si fuera necesario, los aminoácidos de las regiones marco conservadas de las regiones variables de anticuerpo se pueden sustituir de manera que las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante formen un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856). Además, estas FR se pueden sustituir con regiones marco conservadas de anticuerpos humanos de clases o subclases diferentes (véase la Publicación Internacional Nº WO99/51743).

Las regiones marco de anticuerpos humanos conectadas por CDR se seleccionan de tal manera que las regiones determinantes de complementariedad forman un sitio de unión a antígeno favorable. Si fuese necesario, los aminoácidos en las regiones marco de las regiones variables de los anticuerpos se pueden sustituir de manera que las regiones determinantes de complementariedad del anticuerpo humano reformado resultante forman un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856).

Los aminoácidos de las regiones variables (por ejemplo, las FR) o las regiones constantes del anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado preparado de esta manera se pueden sustituir, por ejemplo, por otros aminoácidos.

La sustitución de aminoácidos es la sustitución de, por ejemplo menos de 15, menos de 10, 8 o menos, 7 o menos, 6 o menos, 5 o menos, 4 o menos, 3 o menos, o 2 o menos aminoácidos, preferentemente 1 a 5 aminoácidos, más preferentemente 1 o 2 aminoácidos. El anticuerpo sustituido debería ser funcionalmente equivalente a un anticuerpo no sustituido. La sustitución será una sustitución de aminoácidos deseablemente conservadora, que es la sustitución entre aminoácidos con propiedades similares tales como la carga, cadenas laterales, polaridad, y aromaticidad. Los aminoácidos se pueden clasificar en términos de propiedades similares por ejemplo, en: aminoácidos básicos (arginina, lisina, e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico y ácido glutámico); aminoácidos polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína, y tirosina); aminoácidos no polares (leucina, isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina); aminoácidos ramificados (leucina, valina, e isoleucina); y aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, triptófano, e histidina).

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

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

Un método para preparar un polipéptido funcionalmente equivalente a cierto polipéptido, que implica la introducción

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

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

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

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

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

Para el anticuerpo humanizado, sustituyéndolos ADN en los que las secuencias que codifican las CDR de los ADN que codifican las regiones variables de cadena ligera o pesada derivadas de un anticuerpo humano se sustituyen por las secuencias codificantes de las CDR correspondientes derivadas de un anticuerpo de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo o pollo) se pueden preparar y unir con los ADN que codifican las regiones constantes de cadena ligera o pesada derivadas de anticuerpo humano para preparar un ADN que codifica el anticuerpo humanizado.

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

El anticuerpo de cadena sencilla se refiere a un anticuerpo que comprende regiones variables de cadena ligera y

pesada unidas linealmente entre ellas mediante un enlazador. Se puede preparar un ADN que codifica el anticuerpo de cadena sencilla uniendo un ADN que codifica la región variable de cadena pesada, un ADN que codifica el enlazador, y un ADN que codifica la región variable de cadena ligera. En este contexto, las regiones variables de cadenas pesada y ligera se derivan ambas de un anticuerpo humano o se derivan de un anticuerpo humano en las que solo las CDR se sustituyen por CDR de un anticuerpo derivado de un animal no humano (por ejemplo, ratón, rata, conejo, o pollo). El enlazador consiste en 12 a 19 aminoácidos. Ejemplos del mismo incluyen el $(G_4S)_3$ que consiste en 15 aminoácidos (G.B. Kim et al., Protein Engineering Design and Selection 2007, 20 (9): 425-432).

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

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

Ejemplos del anticuerpo de la presente invención preparado por cualquiera de los métodos descritos anteriormente incluye el siguiente anticuerpo (a):

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

En el presente documento, las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9 y 10 se corresponden con las regiones variables de cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos que se muestran por la SEQ ID NO: 12, 13 y 14 se corresponden con las regiones variables de cadena ligera CDR1, CDR2, y CDR3, respectivamente.

Ejemplos del anticuerpo humanizado, el anticuerpo quimérico, el anticuerpo de cadena sencilla, o el anticuerpo biespecífico de la presente invención incluyen los siguientes anticuerpos (I) a (III):

(I) un anticuerpo que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9, y 10, respectivamente, regiones marco conservadas derivadas de un anticuerpo humano y una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1, CDR2 y la CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente, y regiones marco derivadas de anticuerpos;
(II) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la CDR1, la CDR2 y la CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las regiones marco que provienen de anticuerpos humanos, y una regió constante de cadena pesada derivada de anticuerpo humano, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la CDR1, CDR2, y CDR3 que consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente, y regiones marco conservadas de un anticuerpo humano y una región constante de cadena ligera derivada de anticuerpo humano; y
(III) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11 y una región constante de cadena pesada derivada de un anticuerpo humano, y una cadena ligera que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y una región constante de cadena ligera derivada de un anticuerpo humano.

Las secuencias de la región constante y variable de las cadenas pesada y ligera de anticuerpo humano están disponibles, por ejemplo, en NCBI (EE. UU.; GenBank, UniGene, etc.). Por ejemplo, se puede hacer referencia a las secuencias siguientes: Registro Nº J00228 para la región constante de cadena pesada de IgG1 humana; Registro Nº J00230 para una región constante de cadena pesada de IgG2 humana; Registro Nº X03604 para una región constante de cadena pesada de IgG3 humana; Registro Nº K01316 para una región constante de cadena pesada de IgG4 humana; Registros Nº V00557, X64135, X64133, etc. para una región constante κ de cadena ligera humana; y

los Registros Nº X64132, X64134, etc. para una región constante λ de cadena ligera humana.

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

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

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

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

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

Ejemplos del agente antitumoral incluyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las bibliografías, etc.: paclitaxel, doxorrubicina, daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracilo, tiotepa, busulfan, improsulfan, piposulfan, benzodopa, carbocuona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida, trimetilolomelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongistatina, clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido hidrocloruro de mecloretamina, melfalán, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, calicreamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, epirrubicina, esorrubicina, 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, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, andrógenos (por ejemplo, calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostano, y testolactona), aminoglutetimida, mitotano, trilostano, ácido frolínico, aceglatona, aldofosfamida glucósido, ácido aminolevulínico, eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diazicuona, elfornitina, eliptinium acetato, epotilona, etoglúcido, lentinan, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbacina, razoxano, rizoxina, esquizofilan, espirogermanio, ácido tenuazónico, triazicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobroman, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterina, Xeloda, ibandronato, irinotecan, inhibidores de la topoisomerasa, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinoico, capecitabina, y sales farmacéuticamente aceptables y derivados de los mismos.

De manera alternativa, el anticuerpo de la presente invención se puede administrar en combinación con un agente antitumoral para producir un efecto terapéutico más alto. Esta estrategia se puede adaptar a un paciente con cáncer que expresa CAPRINA-1 antes o después de la operación quirúrgica. Esta estrategia se puede aplicar, particularmente después de la cirugía, a un cáncer que expresa CAPRINA-1, que se ha tratado de manera convencional con un agente antitumoral solo, para producir una mayor prevención de la recurrencia del cáncer o la prolongación del tiempo de supervivencia.

Los ejemplos del agente antitumoral usados en la administración combinada con el anticuerpo de la presente invención incliyen los siguientes agentes antitumorales conocidos en las referencias, etc: paclitaxel, doxorrubicina,

daunorrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil, tiotepa, busulfán, improsulfán, piposulfán, benzodopa, carbocuona, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenomelamina, trietilenofosforamlda, trletilenotlofosforamida, trimetilolomelamina, bullatacina, bullatacinona, camptotecina, briostatina, calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarrnicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictiina, espongistatina, clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, mecloretamlna clorhidrato de óxido, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo, carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aciacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserlna, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorblcina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, Adriamicina, eplrubicina, esorabiclna, idarubicina, marcellomicina, mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamiclna, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zlnostatina, zorrubicina, denopterina, pteropterlna, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tlamiprina, tioguanlna, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, cannofur, citarabina, dldesoxiuridlna, doxifluridina, enocitabina, floxuridina, calusterona, propionato de dromostanolona, epitlostanol, mepitiostano, testolactona, aminoglutetimida, mltotano, trilostano, ácido frolínico, aceglatona, glucósido de aldofosfamida, ácido aminolevulínico eniluracilo, amsacrina, bestrabucilo, bisantreno, edatraxato, defofamina, demecolcina, diaziquona, elfornitbina, acetato de eliptinio, epotilona, etoglúcido, lentinán, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, fenamet, pirarrubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbacina, razoxaneo rizoxina, esquizofiilán, espirogermanio, ácido tenuazónico, triacicuona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, mannomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromán, gacitosina, docetaxel, clorambucilo, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, vinblastina, etopósido, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, tenipósido, edatrexato, daunomicina, aminopterin, Xeloda, ibandronato, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa, difluorometilomitina (DM.FO), ácido retinoico, capecitabina, y sales (conocidas en la técnica) y derivados (conocidos en la técnica) farmacéuticamente aceptables de los mismos. De estos agentes antitumorales, preferentemente se usan en particular ciclofosfamida, paclitaxel, docetaxel, o vinorelbina.

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

< Identificación del epítopo >

Como se muestra en los Ejemplos posteriores, el anticuerpo de la presente invención se une a un epítopo de la secuencia de aminoácidos que se establece en SEQ ID NO: 5. Un ejemplo de un método para confirmar un epítopo para el anticuerpo de la presente invención incluye un método que implica la inmovilización de un epítopo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 en una placa y evaluar el anticuerpo en cuanto a su reactividad con este epítopo. Específicamente, se inmoviliza en una placa un epítopo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 mediante una reacción con grupos funcionales electrófilos mediante un espaciador tal como el oligoetilenglicol. El anticuerpo de la presente invención se puede hacer reaccionar con la placa y examinarse en cuanto a su reactividad con el epítopo mediante la reacción con un anticuerpo secundario marcado (por ejemplo, marcado con peroxidasa de rábano rusticano) que se une al anticuerpo de la presente invención (es decir, se puede confirmar de este modo el epítopo al que se une el anticuerpo de la presente invención). Como el epítopo del polipéptido de SEQ ID NO: 5 que se va a inmovilizar se usa una secuencia que comprende en ella al menos el epítopo de la secuencia de SEQ ID NO: 5 o una parte modificada del mismo (por ejemplo, con los restos del extremo N o el extremo C modificados con cualquier aminoácido o una proteína tal como KLH o un (poli)péptido modificado con una proteína MAP). El anticuerpo de la presente invención solo necesita unirse a cualquiera de estos (poli)péptidos.

Por otra parte, algunos anticuerpos de la presente invención pueden no reaccionar con el polipéptido de SEQ ID NO: 5, es decir, no se puede confirmar el epítopo, en el método anterior. En este caso, el epítopo para el anticuerpo de la presente invención se puede confirmar haciendo reaccionar el anticuerpo con el antígeno en condiciones de solución que faciliten la unión antígeno-anticuerpo, obteniendo el complejo antígeno-anticuerpo resultante por un método de inmunoprecipitación, y después, separando un polipéptido parcial unido con el anticuerpo, y analizando su secuencia de aminoácidos. En este contexto, el antígeno puede ser, por ejemplo, el propio polipéptido de SEQ ID NO: 5 o una parte modificada del mismo. De manera alternativa, se puede utilizar incluso una proteína CAPRINA-1 siempre que el epítopo que reacciona con el anticuerpo de la presente invención se pueda confirmar por el método anterior.

< Efecto antitumoral >

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

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

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

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

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

Un gran número de moléculas de CAPRINA-1 que se pueden unir a anticuerpos anti-CAPRINA-1 en la superficie de células cancerosas produce una actividad antitumoral más fuerte. Deseablemente, para el fin de las expectativas del efecto antitumoral, el número de dichas moléculas de CAPRINA-1 es 10 o más, preferentemente 10^5 o más, por célula cancerosa a los cuales se une el anticuerpo tal como se determina usando el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de la presente invención. El tumor (células cancerosas) que tienen un gran número de moléculas de CAPRINA-1 en la superficie celular es particularmente preferido como cáncer para recibir el anticuerpo de la presente invención.

< Unión a las células que expresan el antígeno >

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

< Tinción inmunohistoquímica >

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento del mismo de la presente invención se puede administrar a un sujeto para tratar y/o prevenir el cáncer, preferentemente cáncer de mama, cáncer de riñón,

cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello de útero, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma, o melanoma.

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

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

< Polipéptido y ADN >

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

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

Ejemplos adicionales del ADN que codifica el anticuerpo de la presente invención incluye un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y un ADN que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, en el caso del anticuerpo (a). En este contexto, la secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, por ejemplo, es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 16. La secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15, por ejemplo, es la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 17.

Cuando dicho ADN comprende una región que codifica cada región constante de cadena pesada y ligera, la región comprende preferentemente una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos derivada de un anticuerpo humano (la secuencia de aminoácidos de cada región constante de la cadena pesada y ligera).

Estos ADN de anticuerpo se pueden obtener por ejemplo, por los métodos descritos anteriormente o el siguiente método: primero, se preparan los ARN totales a partir de hibridomas que producen el anticuerpo de la presente invención utilizando un kit de extracción de ARN disponible en el mercado, y se sintetizan los ADNc a partir del mismo utilizando una transcriptasa inversa y cebadores aleatorios o similares. Posteriormente, los ADNc que codifican el anticuerpo se amplifican por PCR utilizando cebadores de oligonucleótido para las secuencias

conservadas de cada región variable en genes de cadena pesada y ligera de anticuerpo de ratón. Las secuencias que codifican las regiones constantes se pueden obtener por la amplificación por PCR de secuencias conocidas. La secuencia de nucleótidos del ADN se puede incorporar en un plásmido o un fago por secuenciación, por ejemplo, y se determina de acuerdo con un método convencional.

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

(i) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 11, y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 16);
(ii) un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15 y un ADN que codifica el polipéptido (por ejemplo, un ADN que comprende la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 17);
(iii) un polipéptido CDR de cadena pesada que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 8, 9, y 10, y un ADN que codifica el polipéptido; y
(iv) un polipéptido CDR de cadena ligera que se selecciona de entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos que se muestran en SEQ ID NO: 12, 13 y 14, y un ADN que codifican el polipéptido.

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

< Sumario de la presente invención >

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

Ejemplos

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

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

Se examinó la expresión del gen de CAPRINA-1 en tejidos caninos y humanos normales y distintas líneas celulares mediante RT-PCR de acuerdo con el Ejemplo 1 (4) del documento WO2010/016526. Como resultado, se vio una fuerte expresión en los testículos entre los tejidos caninos sanos, mientras que la expresión se vio tejidos de cáncer de mama canino, y adenocarcinomas. Como resultado de la examinación de la expresión también en tejidos humanos, se observó la expresión solo en los testículos entre los tejidos normales, como con el gen de CAPRINA-1 canina. Por el contrario, en relación con las células cancerosas, la expresión se detectó en muchos tipos de líneas celulares de cáncer, incluyendo 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1) y 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPc-3). Estos resultados demostraban que la CAPRINA-1 se expresa en líneas celulares de cáncer de mama y líneas celulares de cáncer pancreático, mientras que su expresión no se detectó en tejidos normales distintos de los testículos.

Ejemplo 2 Preparación de anticuerpo monoclonal de ratón

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

Se mezclaron 100 µg de una proteína CAPRINA-1 humana que tenía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 como se prepara en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 con una cantidad igual de adyuvante MPL+TDM (fabricado por Sigma-Aldrich Corp.). Esta mezcla se utilizó como solución de antígeno para ratón. La solución de antígeno se administró por vía intraperitoneal a cada ratón Balb/c de 6 semanas de edad (fabricado por Japan SLC, Inc.). Después, se llevaron a cabo 7 refuerzos cada semana para completar la inmunización. Tres días después de la administración final se extirpó el bazo de cada ratón y se trituró entre dos portaobjetos de cristal esterilizados. El lavado con PBS (-) (fabricado por Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.), la centrifugación a 1500 rpm durante 10 minutos y la eliminación de un sobrenadante se repitieron tres veces para obtener las células esplénicas. Las células esplénicas obtenidas se mezclaron con células de mieloma de ratón SP2/0 (adquiridas en la ATCC) a una relación de 10:1. Se calentaron 200 µl de un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS a 37 ºC y se mezcló con 800 µl de PEG1500 (fabricado por Boehringer Ingelheim GmbH), y la solución de PEG preparada de esta manera se añadió a la mezcla celular, que se dejó en reposo durante 5 minutos para la fusión celular. Tras la centrifugación a 1700 rpm durante 5 minutos y la eliminación de sobrenadante, las células se suspendieron en 150 ml de un medio RPMI1640 que contenía un 15 % de FBS suplementado con un 2 % equivalente de una solución HAT (/Gibco, (Medio de selección HAT). Esta suspensión se inoculó en quince placas de 96 pocillos (Nunc) a 100 µl/pocillo. Las células esplénicas y las células de mieloma se fusionaron mediante cultivo durante 7 días a 37 ºC con un 5 % de CO_2 para obtener los hibridomas.

Los hibridomas resultantes se exploraron en cuanto a afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los

hibridomas contra las proteínas CAPRINA-1 como indicador. Se añadió una solución de 1 µg/ml de las proteínas CAPRINA-1 preparada según la estrategia descrita en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 ºC durante 18 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de seroalbúmina bovina (BSA) (fabricada por Sigma-Aldrich Corp.) a la misma a una concentración de 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó y se lavó tres veces cada pocillo con 400 µl de PBS-T. Después, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a los mismos a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadieron anticuerpos anti-IgG de ratón (H+L) marcados con HRP (fabricados por Invitrogen Corp.) se diluyeron 5000 veces con PBS a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadió una solución de sustrato TMB a la misma (fabricada por Thermo Fisher Scientific Inc.) a una concentración de 100 µl/pocillo y se dejó reposar durante 15 a 30 minutos para producir la reacción del color. Tras el desarrollo del color, la reacción se finalizó por la adición de ácido sulfúrico 1 N a una concentración de 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, se seleccionaron varios hibridomas que producen anticuerpos que tenían alta absorbancia.

Los hibridomas seleccionados se añadieron a una placa de 96 pocillos a 0,5 células/pocillo y se cultivaron en la placa. Una semana más tarde, los hibridomas que formaban colonias únicas en los pocillos se observaron. Las células de estos pocillos se cultivaron adicionalmente y los hibridomas clonados se exploraron en cuanto a la afinidad de unión de los anticuerpos producidos por los hibridomas contra la proteína CAPRINA-1 como un indicador. Se añadió 1 µg/ml de solución de la proteína CAPRINA-1 preparada mediante la estrategia descrita en el Ejemplo 3 del documento WO2010/016526 a una placa de 96 pocillos a 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a 4 ºC durante 18 horas, Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadió una solución de BSA a la misma a 400 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 horas. La solución de cada pocillo se desechó, y cada pocillo se lavó tres veces con 400 µl de PBS-T. Después, el sobrenadante del cultivo de cada hibridoma obtenido anteriormente se añadió a la misma a 100 µl/pocillo y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después, se añadieron anticuerpos anti-IgG (H+L) de ratón marcado con HRP (fabricado por Invitrogen Corp.) a 100 µl/pocillo de una dilución de 5000 veces con PBS y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 1 hora. Cada pocillo se lavó tres veces con PBS-T. Después se añadió una solución de sustrato TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) a la misma a 100 µl/pocillo y se dejó en reposo durante 15 a 30 minutos para producir la reacción de color. Después del desarrollo del color, la reacción se finalizó mediante la adición de ácido sulfúrico 1 N a 100 µl/pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm y 595 nm utilizando un espectrofotómetro de absorción. Como resultado, se obtuvieron 61 líneas de hibridoma productoras de anticuerpos monoclonales reactivos con proteína CAPRINA-1.

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

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

Los anticuerpos monoclonales contra CAPRINA-1(anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1) que reaccionan contra la superficie de células cancerosas que se obtienen en la sección (1) se utilizaron para identificar una región de epítopo de CAPRINA-1 que se reconoció de esta manera. Se sintetizaron 93 péptidos candidatos que consistían cada uno en 12 a 16 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de la proteína CAPRINA-1 humana y se disolvió cada una a una concentración de 1 mg/ml en DMSO.

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

El sobrenadante del cultivo celular que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 se añadió a 50 µl/pocillo a la placa así obtenida. Tras agitado a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución de cada pocillo se desechó, y

cada pocillo se lavó tres veces con PBST. Después, se añadió al mismo una solución de anticuerpo secundario que contenía anticuerpos anti-IgG de ratón marcado con HRP (fabricado por Invitrogen Corp.) diluidos 3000 a 4000 veces con PBST a 50 µl/pocillo. Después, la solución de cada pocillo se desechó, y se lavó cada pocillo seis veces con PBST.

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

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

(3) Clonación de genes de región variable de anti-CAPRINA-1

Los anticuerpos monoclonales que se obtuvieron en el Ejemplo 2(1) se analizaron en cuanto a sus secuencias genéticas que codifican la región variable y secuencias de aminoácidos de los mismos de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo 5 del documento WO2010/016526. Como resultado el anticuerpo monoclonal n.º º comprendía una región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 11 y la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15. Una secuencia genética que codifica la región variable de la cadena pesada del anticuerpo monoclonal n.º 1 obtenido se muestra en la SEQ ID NO: 16, y la secuencia genética que codifica la región variable de la cadena ligera del anticuerpo monoclonal n.º 1 se muestra en la SEQ ID NO: 17.

También se confirmó que el anticuerpo monoclonal nº 1 obtenido en el Ejemplo 2(1) comprende la región variable de cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO:11 y la región variable de cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 15, en las que las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena pesada consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, 9 y 10, respectivamente, y las CDR1, CDR2, y CDR3 de la región variable de cadena ligera consisten en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 12, 13 y 14, respectivamente.

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

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

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

A continuación, se examinaron 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1) de las que se había confirmado que tenían un gran nivel de expresión genética de CAPRINA-1 en cuanto a su expresión de proteínas CAPRINA-1 en la superficie celular. Se centrifugaron 5 x 10^5 células de cada línea celular de cáncer de mama humano confirmado de esta manera que tenían expresión genética en un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Se añadieron 2 mg (5 µl) de cada uno de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRINA-1 (SEQ ID NO: 5) preparados como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3 y 95 µl de PBS que contenía un 0,1 % de suero fetal bovino y se mezclaron, y se dejaron en reposo durante 1 hora en hielo. Después del lavado con PBS, la solución resultante se mezcló añadiendo 1 µl de anticuerpos de cabra anti-IgG de conejo marcado con Alexa 488 (fabricados por Invitrogen Corp.) y 98 µl de PBS que contenía un 0,1 % de suero fetal bovino (FBS) se añadieron y se mezclaron con las células y se dejó en reposo durante 30 horas en hielo. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). Por otra parte, como control, se llevó a cabo el mismo procesp anterior utilizando los anticuerpos de control que se prepararon como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 3 en vez de los anticuerpos policlonales contra péptidos derivados de CAPRINA-1. Como resultado, las células cancerosas administradas con los anticuerpos anti-CAPRINA-1 todos presentaban una intensidad de fluorescencia

al menos un 35 % más fuerte que la del control. Esto demostraba que las proteínas CAPRINA-1 se expresan en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cáncer humano. La tasa anterior de aumento de la intensidad de fluorescencia se indicó por la tasa de aumento medio en intensidad de fluorescencia (MFI) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

Tasa de incremento en la intensidad de fluorescencia media (Tasa de aumento de intensidad de fluorescencia (%) = ((MFI de células que reaccionan con los anticuerpos anti-CAPRINA-1) – (MFI de control))/ (MFI de control) x 100.

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

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

Ejemplo 5 Preparación de anticuerpo monoclonal quimérico humano-de ratón

El fragmento de amplificación genética que comprende la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena pesada del anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2 se trató en ambos extremos con enzimas de restricción, después se purificaron, y se insertaron de acuerdo con un método de rutina en un vector pcDNA4/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía las inserciones genéticas de una secuencia líder derivada de un anticuerpo de ratón y una región constante de cadena H de IgG_1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6. También se trató el fragmento de amplificación genética que comprende la secuencia de nucleótidos de la región variable de cadena ligera del anticuerpo anti-CAPRINA-1 nº 1 en ambos extremos con enzimas de restricción, luego se purificaron, y se insertaron de acuerdo con un método de rutina en el vector pcDNA3.1/myc-His (fabricado por Invitrogen Corp.) que ya tenía las inserciones genéticas de una secuencia líder derivada de anticuerpo de ratón y una región constante de cadena L de IgG1 humana que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.

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

Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en un matraz de 150 cm^2 a una densidad de 5 x 10^5 células/ml utilizando 30 ml de un medio OptiCHO libre de suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes del cultivo que contenía el anticuerpo monoclonal quimérico humano de ratón nº 1.

También, las líneas celulares que producían establemente los anticuerpos quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 se prepararon como muestras comparativas de la misma manera que anteriormente respectivamente utilizando los siguientes anticuerpos comparativos: anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 derivados del ratón descritos en el documento WO2010/016526, es decir, los anticuerpos comparativos 1 a 11; anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096517 [es decir, un anticuerpo comparativo 12 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (desvelada en el documento WO2011/096517; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; y un anticuerpo comparativo 13 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO, anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096528 [es decir, un anticuerpo comparativo 14 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (desvelada en el documento WO2011/096528; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena

ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 15 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 51 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 55; un anticuerpo comparativo 16 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 59 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 63; un anticuerpo comparativo 17 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 76 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 80; un anticuerpo comparativo 18 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 84 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 88; y un anticuerpo comparativo 19 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 92 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 96], un anticuerpo monoclonal anti-CAPRINA-1 descrito en el documento WO2011/096519 [un anticuerpo comparativo 20 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 42 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 46], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096533 [un anticuerpo comparativo 21 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; un anticuerpo comparativo 22 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 47 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 23 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 67], anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 descritos en el documento WO2011/096534 [un anticuerpo comparativo 24 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 (lo que se describe en dicho documento; se mantiene como cierto para la descripción posterior) y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 47; un anticuerpo comparativo 25 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 43 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 51; y un anticuerpo comparativo 26 que tiene la región variable de cadena pesada que consiste en SEQ ID NO: 63 y la región variable de cadena ligera que consiste en SEQ ID NO: 67]. Cada línea celular preparada se cultivó durante 5 días en matraces de 150 cm^2 a una densidad de 5 x 10^5 células/ml utilizando 30 ml de medio OptiCHO libre de suero (fabricado por Invitrogen Corp.) para obtener los sobrenadantes de los cultivos que contengan cualquiera de los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1-26.

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

A continuación, se examinaron 8 líneas celulares de cáncer de mama humano (ZR75-1, MCF7, T47D, SK-BR-3, MDA-MB-157, BT-20, MDA-MB-231V, y MRK-nu-1), las 2 líneas celulares de cáncer de riñón (Caki-1 y Caki-2), la línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), la línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), las 2 líneas celulares de cáncer de pulmón (QG56 y A549), la línea celular de cáncer de próstata (PC3), la línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), la línea celular de fibrosarcoma (HT1080), las 2 líneas celulares de tumor cerebral (T98G y U87MG), la línea celular de cáncer gástrico (MNK28), las 3 líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo, DLD-1, y HCT-116), y las 4 líneas celulares de cáncer pancreático (Capan-2, MIAPaCa-2, Panc-1, y BxPC-3) de las que se había confirmado que tenían expresión genética de CAPRINA-1 en cuanto a su expresión de proteínas CAPRINA-1 en la superficie celular utilizando el sobrenadante del cultivo que contenía el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 que se obtuvo en el Ejemplo 2. Se centrifugaron 10^6 células de cada línea celular en cada tubo de microcentrífuga de 1,5 ml. Cada sobrenadante del cultivo (100 µl) que contenía el anticuerpo se añadió al tubo y se dejó en reposo durante 1 hora en hielo. Tras el lavado con PBS, se añadieron los anticuerpos de cabra anti-IgG (H+L) de ratón marcado con FITC (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) diluidos con PBS que contenía un 0,1 % de FBS y se dejaron en reposo a 4 ºC durante 30 minutos. Tras el lavado con PBS, se midió la intensidad de fluorescencia utilizando FACScalibur (Becton, Dickinson and Company). El control negativo que se utilizó eran las células que se hacían reaccionar solo con los anticuerpos secundarios. Como resultado, el anticuerpo anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1 presentaba reactividad con una intensidad de fluorescencia al menos un 30 % más fuerte que el control negativo. Esto demostraba que las proteínas CAPRINA-1 se expresaban en la superficie de la membrana celular de las líneas celulares de cánceres humanos. La tasa anterior de aumento de intensidad de fluorescencia se indicaba por la tasa de aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) en cada línea celular y se calculó de acuerdo con la siguiente expresión:

Tasa de incremento en la intensidad de fluorescencia media (Tasa de aumento de intensidad de fluorescencia (%) = ((MFI de células que reaccionan con los anticuerpos anti-CAPRINA-1) – (MFI de control))/ (MFI de control) x 100.

Ejemplo 7 Actividad antitumoral del anticuerpo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 (SEQ ID NO: 5)

Con el fin de evaluar cada anticuerpo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 (SEQ ID NO: 5) en cuanto a su fuerza y su citotoxicidad contra las células que expresan CAPRINA-1, se determinó la actividad ADCC. Los anticuerpos policlonales contra al péptido (SEQ ID NO: 5) preparados en el Ejemplo 3 se utilizaron en esta evaluación. Se llevó a cabo una evaluación similar utilizando anticuerpos policlonales contra otros péptidos derivados de la CAPRINA-1 humana (anticuerpos policlonales contra los restos de aminoácidos de número 50 a 98 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana y anticuerpos policlonales contra los

restos de aminoácidos de número 233 a 305, que se prepararon en el Ejemplo 39 como anticuerpos para compararse y los anticuerpos de control derivados del suero de conejo preparado en el Ejemplo 3 como control negativo.

Las células de cada línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer colorrectal humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 en las que se había confirmado la expresión de CAPRINA-1 en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que se añadieron entonces 100 mCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 ºC durante 2 horas. Después, se lavaron las células tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de suero fetal bovino y se añadieron a una densidad de 2 x 10^3 células/pocillo a cada pocillo de una placa de 96 pocillos con el fondo en V. Los anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 humana (SEQ ID NO: 5) y dos tipos de anticuerpos policlonales de conejo contra otros péptidos derivados de CAPRINA-1 humana (anticuerpos policlonales de conejo contra los restos de aminoácidos números 50 a 98 de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana y anticuerpos policlonales de conejo contra los restos de aminoácido números 233 a 305) como se ha descrito anteriormente se añadieron por separado a una concentración de 1 mg/pocillo. Los linfocitos separados de la sangre periférica de seres humanos o conejos de acuerdo con un método de rutina se añadieron posteriormente a los mismos a una densidad de 4 x 10^5 células/pocillo y se cultivaron a 37 ºC durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO_2. Tras el cultivo, se midió la cantidad de cromo (Cr) 51 liberado por las células cancerosas dañadas en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad ADCC contra las células cancerosas de los anticuerpos policlonales de conejo contra cada péptido derivado de CAPRINA-1 humana. Como resultado, todos los anticuerpos policlonales de conejo obtenidos por inmunización con los péptidos parciales de CAPRINA-1 humana que tenían una secuencia de aminoácidos de restos de aminoácidos número 50 a 98 o restos de aminoácidos de número 233 a 30 de SEQ ID NO: 2 de la CAPRINA-1 humana tenían una actividad menor del 8 % contra la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56. Por el contrario, se confirmó que los grupos suplementados con los anticuerpos policlonales de conejo contra el péptido derivado de CAPRINA-1 humana (SEQ ID NO: 5) tenían una actividad citotóxica del 28 % o más contra todas las células cancerosas. Estos resultados demostraban que el anticuerpo contra CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 ejercen una actividad citotóxica fuerte contra las células cancerosas que expresan CAPRINA-1.

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

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

De manera similar, los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón que se obtuvieron en el Ejemplo 5 se evaluaron en cuanto a su actividad citotóxica contra las células cancerosas humanas. El sobrenadante del cultivo de cada línea celular que producía cualquiera de los anticuerpos se purificó utilizando Sepharose FF Hitrap Proteína A (fabricado por GE Healthcare Bio-Sciences Ltd.). Tras la sustitución con PBS (-), la solución se filtró a través de un filtro de 0,22 mm (fabricado por MIllipore Corp.). El anticuerpo resultante se utilizó para el ensayo de actividad. Se recolectaron 10^6 células de cada una de línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-231V, la línea celular de cáncer de intestino grueso humano DLD-1, línea celular de cáncer pancreático humano Capan-2, y la línea celular de cáncer de pulmón humano QG56 en un tubo de centrífuga de 50 ml, al que se añadieron entonces 100 mCi de cromo 51, seguido por incubación a 37 ºC durante 2 horas. Después, las células se lavaron tres veces con un medio RPMI1640 que contenía un 10 % de FBS y se añadieron a una densidad de 2 x 10^3 células/pocillo a cada placa de 96 pocillos de fondo en V para preparar las células diana. Los anticuerpos purificados (anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1) y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 obtenidos en el Ejemplo 5 se añadieron cada uno a una concentración de 0,75 mg/pocillo. Se separó una población celular que contenía células NK humanas utilizando un método de rutina a partir de linfocitos de sangre periférica humana preparados de acuerdo con un método de rutina. La población celular que contenía células NK humanas que se utilizó en esta evaluación se preparó de la siguiente manera: se hicieron reaccionar las células mononucleares de sangre periférica humana separadas utilizando una solución Histopaque de separación por gravedad específica para separación celular mononuclear en sangre periférica (Sigma-Aldrich Corp.) con anticuerpos marcados con un colorante fluorescente FITC (anticuerpo anti-CD3 humano, anticuerpo anti-CD20 humano, anticuerpo anti-CD19 humano, anticuerpo anti-CD11c humano, o anticuerpo anti-HLA-DR (Becton, Dickinson and Company)), y una población celular que contenía células NK sin teñir con los anticuerpos se separó como células efectoras utilizando un clasificador celular (FACS Vantage SE (Becton, Dickinson and Company)) o el kit de separación de células NK humanas (fabricado por Miltenyi Biotec K.K.). La población celular separada que contenía las células NK se añadió a la placa a una densidad de 2 x 10^5 células /pocillo y se cultivó a 37 ºC durante 4 horas en condiciones de un 5 % de CO_2. Tras el cultivo, la cantidad de cromo 41 liberado de las células tumorales dañadas se midió en el sobrenadante del cultivo para calcular la actividad citotóxica de cada anticuerpo anti-

CAPRINA-1 contra las células cancerosas. El control negativo que se utilizó eran las células suplementadas con anticuerpos de isotipo de control. Como resultado, los anticuerpos de isotipo de control que se utilizaron tenían una actividad citotóxica de menos del 5 % contra todas las líneas celulares de cáncer, y los anticuerpos monoclonales quiméricos humanos-de ratón comparativos 1 a 26 utilizados tenían una actividad citotóxica de menos del 5 % contra MDA-MB-231V, menos del 8 % contra DLD-1, menos del 6 % contra Capan-2, y menos del 6 % contra QG56. Por el contrario, los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1 tenían una actividad citotóxica del 14 % o más contra MDA-MB-231V, del 21 % o más contra DLD-1, un 27 % o más contra Capan-2, y un 20 % o más contra QG56. De la misma manera los anticuerpos de isótopo de control que se utilizaron y los anticuerpos comparativos 1 a 26 que se utilizaron tenían una actividad citotóxica menor del 4 % contra todas las otras células cancerosas , las líneas celulares de cáncer de mama T47D, Hs578T, BT-20, SK-BR-3, MCF7, y MRK-nu-1, una línea celular de glioma T98G, una línea celular de cáncer de pulmón A549, una línea celular de cáncer de riñón Caki-1, una línea celular de cáncer de cuello uterino SW756, una línea celular de cáncer de vejiga urinaria T24, una línea celular de cáncer gástrico MKN28, una línea celular de cáncer de intestino grueso SW480, una línea celular de leucemia AML5, y una línea celular de linfoma Ramos. Por el contrario, se confirmó que los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón tenían un 10 % o más de actividad citotóxica contra estas líneas celulares. Estos resultados mostraban que los anticuerpos contra el péptido derivado de CAPRINA-1 que se muestra en SEQ ID NO: 5 dañaban las células cancerosas que expresan CAPRINA-1 mediante su actividad ADCC, y demostraban que los anticuerpos quiméricos anti-CAPRINA-1 humanos-de ratón nº 1 presentaba una actividad citotóxica más fuerte contra las células cancerosas humanas que las de los anticuerpos comparativos 1 a 26.

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

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

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

Se examinaron una línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-231V), una línea celular de cáncer de riñón (Caki-1), una línea celular de cáncer de vejiga urinaria (T24), una línea celular de cáncer ovárico (SKOV3), líneas celulares de cáncer de pulmón (QC56 y A549), una línea celular de cáncer pancreático (Capan-2), una línea celular de cáncer de próstata (PC3), una línea celular de cáncer de cuello uterino (SW756), una línea celular de fibrosarcoma (HT1080), una línea celular de tumor cerebral (T98G), una línea celular gástrica (MKN28), líneas celulares de cáncer de intestino grueso (Lovo y DLD-1), una línea celular de leucemia (AML5), y una línea celular de linfoma (Ramos) utilizando un kit “QIFIKIT” de número de moléculas (fabricado por Dako Japan Inc.) en cuanto al número de moléculas de CAPRINA-1 sobre su superficie celular reconocidas por los anticuerpos anti-CAPRINA-1 de ratón nº 1. De manera similar, el número de CAPRINA-1 de la superficie de estas distintas células de cáncer también se examinaron utilizando los anticuerpos monoclonales anti-CAPRINA-1 comparativos 1 a 26 preparados en el Ejemplo 5.

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

Aplicabilidad industrial

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

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Toray Industries, Inc.

<120> Composición farmacéutica para tratar y/o prevenir el cáncer

<130> PH-5510-PCT

<150> JP 2012-035342
<151> 21-02-2012

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.1

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

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

<400> 1

```
cagagggctg ctggctggct aagtccctcc cgctcccggc tctcgcctca ctaggagcgg     60

ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc    120

ggaagggacc gccacccttg ccccctcagc tgcccactcg tgatttccag cggcctccgc    180

gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg     231
          Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
          1               5                   10

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

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

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

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

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

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

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

```
ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa      615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu
            130                 135                 140

cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa      663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys
        145                 150                 155

ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga      711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly
    160                 165                 170

gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat      759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr
175                 180                 185                 190

aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag      807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln
                195                 200                 205

tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa      855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu
            210                 215                 220

aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag      903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu
        225                 230                 235

cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat      951
Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn
    240                 245                 250

ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac      999
Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp
255                 260                 265                 270

cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa     1047
Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln
                275                 280                 285

agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa     1095
Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu
            290                 295                 300

aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt     1143
Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val
        305                 310                 315

gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca     1191
Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala
    320                 325                 330

tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca     1239
Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala
335                 340                 345                 350

gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg     1287
Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met
                355                 360                 365

cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat     1335
Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn
```

```
            370                 375                 380

cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca     1383
Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr
        385                 390                 395

caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa     1431
Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu
    400                 405                 410

tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca     1479
Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr
415                 420                 425                 430

cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa     1527
Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln
                435                 440                 445

ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa     1575
Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu
            450                 455                 460

cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act     1623
Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr
        465                 470                 475

aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag     1671
Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln
    480                 485                 490

gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca     1719
Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala
495                 500                 505                 510

gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt     1767
Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val
                515                 520                 525

cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag     1815
Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln
            530                 535                 540

gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa     1863
Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln
        545                 550                 555

aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat     1911
Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His
    560                 565                 570

ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct     1959
Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro
575                 580                 585                 590

cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat     2007
Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn
                595                 600                 605

agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg     2055
Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met
            610                 615                 620

aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt     2103
```

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

tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct     2151
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser
    640                 645                 650

cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat     2199
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr
655                 660                 665                 670

cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc     2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala
                675                 680                 685

cca cga ggt cgt gga ggg ccc cca aga ccc aac aga ggg atg ccg caa     2295
Pro Arg Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln
            690                 695                 700

atg aac act cag caa gtg aat taa tctgattcac aggattatgt ttaatcgcca    2349
Met Asn Thr Gln Gln Val Asn
        705

aaaacacact ggccagtgta ccataatatg ttaccagaag agttattatc tatttgttct   2409

ccctttcagg aaacttattg taaagggact gttttcatcc cataaagaca ggactacaat   2469

tgtcagcttt ctattacctg gatatggaag gaaactattt ttactctgca tgttctgtcc   2529

taagcgtcat cttgagcctt gcacatgata ctcagattcc tcacccttgc ttaggagtaa   2589

aacaatatac tttacagggt gataataatc tccatagtta tttgaagtgg cttgaaaaag   2649

gcaagattga cttttatgac attggataaa atctacaaat cagccctcga gttattcaat   2709

gataactgac aaactaaatt atttccctag aaaggaagat gaaaggagtg gagtgtggtt   2769

tggcagaaca actgcatttc acagcttttc cagttaaatt ggagcactga acgttcagat   2829

gcataccaaa ttatgcatgg gtcctaatca cacatataag gctggctacc agctttgaca   2889

cagcactgtt catctggcca aacaactgtg gttaaaaaca catgtaaaat gctttttaac   2949

agctgatact gtataagaca aagccaagat gcaaaattag gctttgattg gcacttttg    3009

aaaaatatgc aacaaatatg ggatgtaatc cggatggccg cttctgtact taatgtgaaa   3069

tatttagata ccttttttgaa cacttaacag tttctttgag acaatgactt ttgtaaggat   3129

tggtactatc tatcattcct tatgacatgt acattgtctg tcactaatcc ttggattttg   3189

ctgtattgtc acctaaattg gtacaggtac tgatgaaaat ctctagtgga taatcataac   3249

actctcggtc acatgttttt ccttcagctt gaaagctttt ttttaaaagg aaaagatacc   3309

aaatgcctgc tgctaccacc cttttcaatt gctatctttt gaaaggcacc agtatgtgtt   3369

ttagattgat ttccctgttt cagggaaatc acggacagta gtttcagttc tgatggtata   3429

agcaaaacaa ataaaacgtt tataaaagtt gtatcttgaa acactggtgt tcaacagcta   3489

gcagcttatg tgattcaccc catgccacgt tagtgtcaca aattttatgg tttatctcca   3549
```

gcaacatttc tctagtactt gcacttatta tcttttgtct aatttaacct taactgaatt 3609

ctccgtttct cctggaggca tttatattca gtgataattc cttcccttag atgcataggg 3669

agagtctcta aatttgatgg aaatggacac ttgagtagtg acttagcctt atgtactctg 3729

ttggaatttg tgctagcagt ttgagcacta gttctgtgtg cctaggaagt taatgctgct 3789

tattgtctca ttctgacttc atggagaatt aatcccacct ttaagcaaag gctactaagt 3849

taatggtatt ttctgtgcag aaattaaatt ttattttcag catttagccc aggaattctt 3909

ccagtaggtg ctcagctatt taaaaacaaa actattctca aacattcatc attagacaac 3969

tggagttttt gctggttttg taacctacca aaatggatag gctgttgaac attccacatt 4029

caaaagtttt gtagggtggt gggaaatggg ggatcttcaa tgtttatttt aaaataaaat 4089

aaaataagtt cttgactttt ctcatgtgtg gttgtggtac atcatattgg aagggttaac 4149

ctgttacttt ggcaaatgag tatttttttg ctagcacctc cccttgcgtg ctttaaatga 4209

catctgcctg ggatgtacca caaccatatg ttacctgtat cttaggggaa tggataaaat 4269

atttgtggtt tactgggtaa tccctagatg atgtatgctt gcagtcctat ataaaactaa 4329

atttgctatc 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 acagtttaaa tgtatatctt ttatgtctct actcagacca 4629

tatttttaaa ggggtgcctc attatggggc agagaacttt tcaataagtc tcattaagat 4689

ctgaatcttg gttctaagca ttctgtataa tatgtgattg cttgtcctag ctgcagaagg 4749

ccttttgttt ggtcaaatgc atattttagc agagtttcaa ggaaatgatt gtcacacatg 4809

tcactgtagc ctcttggtgt agcaagctca catacaaaat acttttgtat atgcataata 4869

taaatcatct catgtggata tgaaacttct tttttaaaac ttaaaaaggt agaatgttat 4929

tgattacctt gattagggca gttttatttc cagatcctaa taattcctaa aaaatatgga 4989

aaagtttttt ttcaatcatt gtaccttgat attaaaacaa atatccttta agtatttcta 5049

atcagttagc ttctacagtt cttttgtctc cttttatatg cagctcttac gtgggagact 5109

tttccactta aaggagacat agaatgtgtg cttattctca gaaggttcat taactgaggt 5169

gatgagttaa caactagttg agcagtcagc ttcctaagtg ttttaggaca tttgttcatt 5229

atattttccg tcatataact agaggaagtg gaatgcagat aagtgccgaa ttcaaaccct 5289

tcattttatg tttaagctcc tgaatctgca ttccacttgg gttgttttta agcattctaa 5349

attttagttg attataagtt agatttcaca gaatcagtat tgcccttgat cttgtccttt 5409

ttatggagtt aacggggagg aagacccctc aggaaaacga aagtaaattg ttaaggctca 5469

tcttcatacc tttttccatt ttgaatccta caaaaatact gcaaaagact agtgaatgtt 5529

taaaattaca ctagattaaa taatatgaaa gtc 5562

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

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```
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
```

```
    450                 455                 460

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Arg Gly Gly Pro Pro Arg Pro Asn Arg Gly Met Pro Gln Met Asn
    690                 695                 700

                Thr Gln Gln Val Asn
                705
```

<210> 3

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

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

<400> 3

```
cagagggctg ctggctggct aagtccctcc cgctcccggc tctcgcctca ctaggagcgg      60

ctctcggtgc agcgggacag ggcgaagcgg cctgcgccca cggagcgcgc gacactgccc     120

ggaagggacc gccacccttg ccccctcagc tgcccactcg tgatttccag cggcctccgc     180

gcgcgcacg atg ccc tcg gcc acc agc cac agc ggg agc ggc agc aag tcg      231
          Met Pro Ser Ala Thr Ser His Ser Gly Ser Gly Ser Lys Ser
          1               5                   10

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

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

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

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

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

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

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

ata aag aag aca gca cgt cgg gag cag ctt atg aga gaa gaa gct gaa      615
Ile Lys Lys Thr Ala Arg Arg Glu Gln Leu Met Arg Glu Glu Ala Glu
            130                 135                 140

cag aaa cgt tta aaa act gta ctt gag cta cag tat gtt ttg gac aaa      663
Gln Lys Arg Leu Lys Thr Val Leu Glu Leu Gln Tyr Val Leu Asp Lys
        145                 150                 155

ttg gga gat gat gaa gtg cgg act gac ctg aaa caa ggt ttg aat gga      711
Leu Gly Asp Asp Glu Val Arg Thr Asp Leu Lys Gln Gly Leu Asn Gly
```

```
    160                 165                 170

gtg cca ata ttg tcc gaa gag gag ttg tca ttg ttg gat gaa ttc tat      759
Val Pro Ile Leu Ser Glu Glu Glu Leu Ser Leu Leu Asp Glu Phe Tyr
175                 180                 185                 190

aag cta gta gac cct gaa cgg gac atg agc ttg agg ttg aat gaa cag      807
Lys Leu Val Asp Pro Glu Arg Asp Met Ser Leu Arg Leu Asn Glu Gln
                195                 200                 205

tat gaa cat gcc tcc att cac ctg tgg gac ctg ctg gaa ggg aag gaa      855
Tyr Glu His Ala Ser Ile His Leu Trp Asp Leu Leu Glu Gly Lys Glu
            210                 215                 220

aaa cct gta tgt gga acc acc tat aaa gtt cta aag gaa att gtt gag      903
Lys Pro Val Cys Gly Thr Thr Tyr Lys Val Leu Lys Glu Ile Val Glu
        225                 230                 235

cgt gtt ttt cag tca aac tac ttt gac agc acc cac aac cac cag aat      951
Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His Gln Asn
    240                 245                 250

ggg ctg tgt gag gaa gaa gag gca gcc tca gca cct gca gtt gaa gac      999
Gly Leu Cys Glu Glu Glu Glu Ala Ala Ser Ala Pro Ala Val Glu Asp
255                 260                 265                 270

cag gta cct gaa gct gaa cct gag cca gca gaa gag tac act gag caa     1047
Gln Val Pro Glu Ala Glu Pro Glu Pro Ala Glu Glu Tyr Thr Glu Gln
                275                 280                 285

agt gaa gtt gaa tca aca gag tat gta aat aga cag ttc atg gca gaa     1095
Ser Glu Val Glu Ser Thr Glu Tyr Val Asn Arg Gln Phe Met Ala Glu
            290                 295                 300

aca cag ttc acc agt ggt gaa aag gag cag gta gat gag tgg aca gtt     1143
Thr Gln Phe Thr Ser Gly Glu Lys Glu Gln Val Asp Glu Trp Thr Val
        305                 310                 315

gaa acg gtt gag gtg gta aat tca ctc cag cag caa cct cag gct gca     1191
Glu Thr Val Glu Val Val Asn Ser Leu Gln Gln Gln Pro Gln Ala Ala
    320                 325                 330

tcc cct tca gta cca gag ccc cac tct ttg act cca gtg gct cag gca     1239
Ser Pro Ser Val Pro Glu Pro His Ser Leu Thr Pro Val Ala Gln Ala
335                 340                 345                 350

gat ccc ctt gtg aga aga cag cga gta caa gac ctt atg gca caa atg     1287
Asp Pro Leu Val Arg Arg Gln Arg Val Gln Asp Leu Met Ala Gln Met
                355                 360                 365

cag ggt ccc tat aat ttc ata cag gat tca atg ctg gat ttt gaa aat     1335
Gln Gly Pro Tyr Asn Phe Ile Gln Asp Ser Met Leu Asp Phe Glu Asn
            370                 375                 380

cag aca ctt gat cct gcc att gta tct gca cag cct atg aat cca aca     1383
Gln Thr Leu Asp Pro Ala Ile Val Ser Ala Gln Pro Met Asn Pro Thr
        385                 390                 395

caa aac atg gac atg ccc cag ctg gtt tgc cct cca gtt cat tct gaa     1431
Gln Asn Met Asp Met Pro Gln Leu Val Cys Pro Pro Val His Ser Glu
    400                 405                 410

tct aga ctt gct cag cct aat caa gtt cct gta caa cca gaa gcg aca     1479
```

```
Ser Arg Leu Ala Gln Pro Asn Gln Val Pro Val Gln Pro Glu Ala Thr
415                 420                 425                 430

cag gtt cct ttg gta tca tcc aca agt gag ggg tac aca gca tct caa     1527
Gln Val Pro Leu Val Ser Ser Thr Ser Glu Gly Tyr Thr Ala Ser Gln
                435                 440                 445

ccc ttg tac cag cct tct cat gct aca gag caa cga cca cag aag gaa     1575
Pro Leu Tyr Gln Pro Ser His Ala Thr Glu Gln Arg Pro Gln Lys Glu
            450                 455                 460

cca att gat cag att cag gca aca atc tct tta aat aca gac cag act     1623
Pro Ile Asp Gln Ile Gln Ala Thr Ile Ser Leu Asn Thr Asp Gln Thr
        465                 470                 475

aca gca tca tca tcc ctt cct gct gcg tct cag cct caa gta ttt cag     1671
Thr Ala Ser Ser Ser Leu Pro Ala Ala Ser Gln Pro Gln Val Phe Gln
    480                 485                 490

gct ggg aca agc aaa cct tta cat agc agt gga atc aat gta aat gca     1719
Ala Gly Thr Ser Lys Pro Leu His Ser Ser Gly Ile Asn Val Asn Ala
495                 500                 505                 510

gct cca ttc caa tcc atg caa acg gtg ttc aat atg aat gcc cca gtt     1767
Ala Pro Phe Gln Ser Met Gln Thr Val Phe Asn Met Asn Ala Pro Val
                515                 520                 525

cct cct gtt aat gaa cca gaa act tta aaa cag caa aat cag tac cag     1815
Pro Pro Val Asn Glu Pro Glu Thr Leu Lys Gln Gln Asn Gln Tyr Gln
            530                 535                 540

gcc agt tat aac cag agc ttt tct agt cag cct cac caa gta gaa caa     1863
Ala Ser Tyr Asn Gln Ser Phe Ser Ser Gln Pro His Gln Val Glu Gln
        545                 550                 555

aca gag ctt cag caa gaa cag ctt caa aca gtg gtt ggc act tac cat     1911
Thr Glu Leu Gln Gln Glu Gln Leu Gln Thr Val Val Gly Thr Tyr His
    560                 565                 570

ggt tcc cca gac cag tcc cat caa gtg act ggt aac cac cag cag cct     1959
Gly Ser Pro Asp Gln Ser His Gln Val Thr Gly Asn His Gln Gln Pro
575                 580                 585                 590

cct cag cag aac act gga ttt cca cgt agc aat cag ccc tat tac aat     2007
Pro Gln Gln Asn Thr Gly Phe Pro Arg Ser Asn Gln Pro Tyr Tyr Asn
                595                 600                 605

agt cgt ggt gtg tct cgt gga ggc tcc cgt ggt gct aga ggc ttg atg     2055
Ser Arg Gly Val Ser Arg Gly Gly Ser Arg Gly Ala Arg Gly Leu Met
            610                 615                 620

aat gga tac cgg ggc cct gcc aat gga ttc aga gga gga tat gat ggt     2103
Asn Gly Tyr Arg Gly Pro Ala Asn Gly Phe Arg Gly Gly Tyr Asp Gly
        625                 630                 635

tac cgc cct tca ttc tct aac act cca aac agt ggt tat aca cag tct     2151
Tyr Arg Pro Ser Phe Ser Asn Thr Pro Asn Ser Gly Tyr Thr Gln Ser
    640                 645                 650

cag ttc agt gct ccc cgg gat tac tct ggc tat caa cgg gat gga tat     2199
Gln Phe Ser Ala Pro Arg Asp Tyr Ser Gly Tyr Gln Arg Asp Gly Tyr
655                 660                 665                 670
```

```
cag cag aat ttc aag cga ggc tct ggg cag agt gga cca cgg gga gcc     2247
Gln Gln Asn Phe Lys Arg Gly Ser Gly Gln Ser Gly Pro Arg Gly Ala
                675                 680                 685

cca cga ggt aat att ttg tgg tgg tga tcctagctcc taagtggagc          2294
Pro Arg Gly Asn Ile Leu Trp Trp
            690

ttctgttctg gccttggaag agctgttaat agtctgcatg ttaggaatac atttatcctt   2354

tccagacttg ttgctaggga ttaaatgaaa tgctctgttt ctaaaactta atcttggacc   2414

caaattttaa tttttgaatg atttaatttt ccctgttact atataaactg tcttgaaaac   2474

tagaacatat tctcttctca gaaaaagtgt ttttccaact gaaaattatt tttcaggtcc   2534

taaaacctgc taaatgtttt taggaagtac ttactgaaac atttttgtaa gacatttttg   2594

gaatgagatt gaacatttat ataaatttat tattcctctt tcatttttt gaaacatgcc   2654

tattatattt tagggccaga cacccttaa tggccggata agccatagtt aacatttaga   2714

gaaccattta gaagtgatag aactaatgga atttgcaatg ccttttggac ctctattagt   2774

gatataaata tcaagttatt tctgactttt aaacaaaact cccaaattcc taacttattg   2834

agctatactt aaaaaaaatt acaggtttag agagtttttt gtttttcttt tactgttgga   2894

aaactacttc ccattttggc aggaagttaa cctatttaac aattagagct agcatttcat   2954

gtagtctgaa attctaaatg gttctctgat ttgagggagg ttaaacatca aacaggtttc   3014

ctctattggc cataacatgt ataaaatgtg tgttaaggag gaattacaac gtactttgat   3074

ttgaatacta gtagaaactg gccaggaaaa aggtacattt ttctaaaaat taatggatca   3134

cttgggaatt actgacttga ctagaagtat caaaggatgt ttgcatgtga atgtgggtta   3194

tgttctttcc caccttgtag catattcgat gaaagttgag ttaactgata gctaaaaatc   3254

tgttttaaca gcatgtaaaa agttatttta tctgttaaaa gtcattatac agttttgaat   3314

gttatgtagt ttctttttaa cagtttaggt aataaggtct gttttcattc tggtgctttt   3374

attaattttg atagtatgat gttacttact actgaaatgt aagctagagt gtacactaga   3434

atgtaagctc catgagagca ggtaccttgt ctgtcttctc tgctgtatct attcccaacg   3494

cttgatgatg gtgcctggca catagtaggc actcaataaa tatttgttga atgaatgaa     3553
```

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

<400> 4

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

Pro Pro Pro Pro Ser Gly Ser Ser Gly Ser Glu Ala Ala Ala Gly Ala
```

```
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Ile Leu Trp Trp
    690
```

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

<400> 5

```
Val Glu Arg Val Phe Gln Ser Asn Tyr Phe Asp Ser Thr His Asn His
1               5                   10                  15
```

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

<400> 6

```
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
```

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

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

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

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

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

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

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

<400> 8

Asn Tyr Leu Ile Glu
1 5

<210> 9
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 9

```
Val Ile Asn Pro Lys Ser Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg
1               5                  10                  15

Gly Lys Ala
```

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

<400> 10

```
Thr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
1               5                  10
```

<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 11

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

Ala Ser Val Tyr Ala Phe Thr Asn Tyr Leu Ile Glu Trp Val Lys Gln
            20                  25                  30

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

Gly Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr
    50                  55                  60

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

Ser Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ile Thr Gly Thr Asp Tyr
                85                  90                  95

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro
            100                 105                 110

Pro
```

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 12

```
Val Thr Ile Ser Cys Ser Ala Ser Gln Gly
1               5                   10
```

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

<400> 13

```
Tyr Thr Ser Ser Leu Arg Ser
1               5
```

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

<400> 14

```
Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg Thr
1               5
```

<210> 15
<211> 113
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

<400> 15

```
Gln Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu
1               5                   10                  15

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

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

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

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile
```

65 70 75 80

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

Ser Lys Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 16
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 16

ggagctgagc tggtaaggcc tgggacttca gtgaaggtgt cctgcaaggc ttctgtatac 60

gccttcacta attacttgat agagtgggta aagcagaggc ctggacaggg ccttgagtgg 120

attggagtga ttaatcctaa aagtggtggt actaagtaca atgagaagtt caggggcaag 180

gcaacactga ctgcagacaa atcctccagc actgcctaca tgcagctcag cagcctgaca 240

tctggtgact ctgcggtcta tttctgtgca ataactggga cagactactg gggccaaggc 300

accactctca cagtctcctc agccaaaaca acaccccca 339

<210> 17
<211> 339
<212> ADN
<213> *Mus musculus*

<400> 17

caaggtacca gatgtgatat ccagatgaca cagactacat cctccctgtc tgcctctctg 60

ggcgacagag tcaccatcag ttgcagtgca agtcagggca ttaacaatta tttaaactgg 120

tatcagcaaa aaccagatgg aactgttaaa ctcctgatct attacacatc aagtttacgc 180

tcaggagtcc catcaaggtt cagtggcagt gggtctggga cagattattc tctcaccatc 240

agcaacctgg aacctgaaga tgttgccact tactattgtc agcagtatag taagcttcct 300

cggacgttcg gtggcggcac caagctggaa atcaaacgg 339

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que se unen a un polipéptido parcial de CAPRINA-1 que consiste en la secuencia de aminoácidos establecida en la SEQ ID NO: 5.

2. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o el fragmento del mismo tienen actividad citotóxica contra una célula cancerosa que expresa una proteína CAPRINA-1.

3. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal.

4. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo de cadena sencilla o un anticuerpo multiespecífico.

5. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo comprenden 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 las regiones determinantes de complementariedad de las SEQ ID NO: 12, 13 y 14 (CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente) y se une a la proteína CAPRINA-1.

6. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo o un fragmento del mismo están conjugados con un agente antitumoral.

7. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

8. Una combinación farmacéutica que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7 y una composición farmacéutica que comprende un agente antitumoral.

9. El anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, o la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, o la combinación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso en un método de tratamiento del cáncer.

10. El anticuerpo o un fragmento del mismo, la composición farmacéutica o la combinación farmacéutica para su uso en un método de tratamiento del cáncer de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el cáncer es cáncer de mama, cáncer de riñón, cáncer pancreático, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, tumor cerebral, cáncer gástrico, cáncer de cuello uterino, cáncer ovárico, cáncer de próstata, cáncer de vejiga urinaria, cáncer esofágico, leucemia, linfoma, fibrosarcoma, mastocitoma o melanoma.

11. Un ADN que codifica el anticuerpo o un fragmento del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.