

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 931 477**

51 Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/02 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2011** **E 18182161 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.10.2022** **EP 3404043**

54 Título: **Anticuerpo anti-CDH3 que tiene alta capacidad de internalización**

30 Prioridad:

29.10.2010 JP 2010243708
07.07.2011 JP 2011150812

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
29.12.2022

73 Titular/es:

PERSEUS PROTEOMICS INC. (100.0%)
Park Bldg., 7-6, Komaba 4-chome, Meguro-ku
Tokyo 153-0041, JP

72 Inventor/es:

ISHII, KEISUKE;
KATSUMI, KEIKO;
MATSUURA, TADASHI;
SUDO, YUKIO;
MITOMO, KATSUYUKI y
KOUDA, KATSUSHI

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 931 477 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpo anti-CDH3 que tiene alta capacidad de internalización

Campo técnico

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-cadherina que reconoce un determinado dominio de cadherina y tiene una alta capacidad de internalización. Además, la presente invención se refiere a un conjugado de anticuerpo anti-cadherina-fármaco. Además, la presente divulgación se refiere a un método para el uso de un conjugado de anticuerpo anti-cadherina-fármaco.

Antecedentes de la técnica

Cualquier referencia en la descripción a métodos de tratamiento se refiere a los compuestos, a las composiciones farmacéuticas y a los medicamentos de la presente invención para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano (o animal) mediante terapia (o para diagnóstico).

El cáncer es una enfermedad grave, que es una de las causas principales de muerte, pero la necesidad de tratamiento del mismo aún no se ha satisfecho. Con el fin de solucionar el problema de las técnicas de quimioterapia convencionales, que dañan de manera desventajosa las células normales, en los últimos años se han realizado estudios activos sobre una técnica de tratamiento del cáncer realizada con el uso de un fármaco de direccionamiento molecular que se ha diseñado para seleccionar como diana una molécula específica expresada específicamente en una célula cancerosa.

Un ejemplo de una molécula que puede ser la diana de un fármaco dirigido de manera molecular en el cáncer es la cadherina. La cadherina es una proteína de membrana que se descubrió como molécula asociada con adhesión celular homofílica, dependiente de calcio (documento no de patente 1). Las proteínas que tienen repeticiones de cadherina (EC) compuestas por aproximadamente 110 residuos de aminoácido, que son altamente homólogas entre sí, se denominan superfamilia de cadherina. La superfamilia de cadherina incluye 120 o más especies de proteína y desempeña un papel clave en el mantenimiento de la estructura en capas multicelular.

Se ha notificado que los niveles de expresión de cadherina están elevados en células cancerosas. Por consiguiente, se ha estudiado el uso de un fármaco que comprende un anticuerpo que reconoce la cadherina y un agente anticanceroso unido al mismo o un anticuerpo que tiene actividad citotóxica dependiente de anticuerpos (ADCC) para el tratamiento de cáncer para células cancerosas que presentan un nivel de expresión de cadherina superior en tejido canceroso en comparación con el de en tejido normal (documento de patente 1: documento de patente 2).

Las proteínas que pertenecen a la superfamilia de cadherina pueden clasificarse aproximadamente tal como sigue según las características estructurales de las mismas: 1) cadherinas clásicas; 2) cadherinas desmosómicas; 3) protocadherinas; y 4) otras. Los miembros principales de la superfamilia de cadherina; es decir, cadherinas clásicas tales como E-cadherina (CDH1), N-cadherina (CDH2) y P-cadherina (CDH3) son altamente homólogas entre sí (figura 1). Específicamente, tales proteínas son proteínas transmembrana que atraviesan una sola vez la membrana que se supone que forman dímeros, y tiene 5 dominios extracelulares de cadherina (EC1 a EC5) y dominios intracelulares. La adhesión celular mediada por adherinas clásicas se caracteriza por adhesión entre células homogéneas, y tal adhesión celular tiene lugar cuando las células reconocen la molécula de cadherina de la misma especie que se expresa específicamente y de manera diferente dependiendo de la especie celular. Específicamente, CDH1 reconoce y se une a CDH1, y CDH3 reconoce y se une a CDH3. Por tanto, las células de la misma especie se adhieren entre sí (figura 2).

Se deduce que las cadherinas homólogas/heterólogas las reconoce el dominio de cadherina 1 (EC1) ubicado en el extremo N-terminal del dominio extracelular (documento no de patente 2). Klingel *et al.* demuestran que, incluso cuando se sustituye una secuencia que comprende las posiciones 1 a 213 de la secuencia de aminoácidos de CDH3 humano (SEQ ID NO: 2) por el correspondiente dominio de CDH1 humano, se uniría a CDH3 en lugar de CDH1 (documento no de patente 3). Por tanto, las cadherinas clásicas, incluyendo CDH1 y CDH3, se considera que se unen entre sí basándose en el mismo mecanismo.

En los últimos años, muchos fármacos de anticuerpo para el tratamiento contra el cáncer se han comercializado realmente como fármacos dirigidos molecularmente, y muchos de tales fármacos se basan en el mecanismo de ADCC. Sin embargo, la eficacia farmacológica de los mismos no siempre es suficiente, y se ha intentado el desarrollo de técnicas que ejerzan efectos antitumorales más potentes.

Un ejemplo de un medio eficaz para potenciar la actividad antitumoral del anticuerpo es un conjugado de un anticuerpo y un fármaco altamente tóxico (toxina). Si se administra una toxina a un paciente por sí misma, de manera desventajosa daña los tejidos normales. Por consiguiente, no puede servir como medio terapéutico eficaz. Al unir una toxina a un anticuerpo que se une a un antígeno específico de célula tumoral, sin embargo, una toxina puede destruir

selectivamente células tumorales sin afectar adversamente al tejido normal. Tales fármacos se denominan “conjugados de anticuerpo-fármaco (ADC)”. Específicamente, una toxina no ejerce su toxicidad mientras está unida a un anticuerpo. Sin embargo, algunos anticuerpos se incorporan dentro de las células cuando los anticuerpos se unen a un antígeno diana, y entonces se degradan en los lisosomas. Por consiguiente, tales anticuerpos que comprenden toxinas unidas a los mismos se incorporan y degradan en células, se liberan las toxinas, se expresa selectivamente la toxicidad en células específicas y se destruyen las células de ese modo.

En ADC, los fármacos unidos a anticuerpos circulan en la sangre, y tales fármacos se acumulan y ejercen eficacia farmacológica en células tumorales diana. No es preferible que un fármaco se libere en cualquier sitio distinto de regiones tumorales (es decir, liberación de anticuerpos) debido a un riesgo de efectos secundarios adversos. Es decir, es preferible que los ADC se diseñen de una manera tal que los fármacos unidos a anticuerpos se incorporen en primer lugar a células y luego se liberen de los anticuerpos. Desde tal punto de vista, Genentech Inc. ha desarrollado fármacos que comprenden trastuzumab y toxina unida al mismo (T-DM1), los fármacos desarrollados se han sometido a pruebas clínicas, y tales fármacos ejercen efectos clínicos notablemente altos. Es decir, no es suficiente si los ADC simplemente se acumulan en células cancerosas diana, y es necesario que los ADC se incorporen eficazmente en las células cancerosas. Tal capacidad (la capacidad de internalización de un anticuerpo) está estrechamente relacionada con la eficacia farmacológica de ADC.

La capacidad de internalización de un anticuerpo se ve afectada tanto por la proteína de superficie de membrana a la que se une un anticuerpo como un anticuerpo propio. Por consiguiente, tal capacidad no puede deducirse inequívocamente basándose en la estructura molecular, las propiedades físicas del anticuerpo u otros factores. El examen de anticuerpos relevantes con una alta capacidad de internalización contra antígenos es por consiguiente un gran objetivo en el desarrollo de ADC. La presente invención pretende superar tal objetivo con respecto al antígeno CDH3. El documento EP 2 426 149 se refiere a un anticuerpo anti-cadherina que tiene alta citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, en particular a un anticuerpo anti-cadherina, que reconoce una cualquiera de la región en el sentido de 5' de EC1, un dominio de cadherina 4 (EC4) y un dominio de cadherina 5 (EC5). Zhang *et al.* 2008 (AACR Meeting Abstracts, 2008-04-16, p. 1-2) y Zhang *et al.* 2010 (Clin Cancer Res. 2010; 16(21):5177-88) se refieren a la caracterización de las propiedades biológicas de PF-03732010, un anticuerpo monoclonal humano contra P-cadherina, en ensayos basados en células y modelos tumorales.

Tal como se describió anteriormente, se ha conocido el concepto de tratamiento del cáncer con el uso de ADC. Sin embargo, ninguna de tales técnicas sugiere la eficacia de un complejo inmunitario resultante de la conjugación de un anticuerpo anti-cadherina que tiene una alta capacidad de internalización con un fármaco. Aunque se ha notificado la correlación entre la estructura de los dominios y la función de cadherina, no se ha hecho ningún informe con respecto a la correlación entre la estructura de los dominios y la capacidad de internalización.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO 2002/097395

Documento de patente 2: WO 2007/102525

Documentos no de patente

Documento no de patente 1: Yoshida y Takeichi, Cell 28: 217-224, 1982

Documento no de patente 2: Nose, A. *et al.*, Cell 61; 147-155, 1990

Documento no de patente 3: Klingel, H. *et al.*, Journal of Cell Science 113: 2829-36, 2000

Sumario de la invención

Objetos que van a solucionarse mediante la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un anticuerpo anti-cadherina que tiene una alta capacidad de internalización. Otro objeto de la presente invención es proporcionar un conjugado de anticuerpo anti-cadherina-fármaco que destruye eficazmente células cancerosas que expresan cadherina con el uso de tal anticuerpo.

Medios para solucionar los objetos

Los presentes inventores han realizado estudios concentrados con el fin de solucionar los objetos anteriores. Sometieron a ensayo la capacidad de internalización del anticuerpo anti-CDH3 humano y descubrieron que cada anticuerpo ejercía una capacidad de internalización diferente. Por tanto, clasificaron los anticuerpos dependiendo de los dominios reconocidos de ese modo y descubrieron que sería altamente probable que anticuerpos con una alta

capacidad de internalización reconocieran el dominio de cadherina 1 (EC1).

Los ejemplos de factores que definen la capacidad de internalización del anticuerpo incluyen la afinidad de un anticuerpo por un antígeno y un epítipo reconocido por un anticuerpo, aunque los detalles de lo mismo siguen sin conocerse. La presente invención se ha completado realizando exámenes al tiempo que se centraba el foco especialmente en la correlación entre un anticuerpo y un epítipo reconocido de ese modo.

Según la presente invención, se proporciona lo siguiente.

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Por consiguiente, la presente invención proporciona un agente citotóxico que comprende un anticuerpo monoclonal IgG anti-p-cadherina, que reconoce un dominio de cadherina 1 (EC1) de p-cadherina y presenta una alta capacidad de internalización, en el que la alta capacidad de internalización es una viabilidad sometida a ensayo de células que expresan CDH3 que es del 60% o menos, cuando el anticuerpo se administra con un anticuerpo anti-IgG marcado con saporina, en el que la célula que expresa CDH3 es la línea celular de cáncer de mama HCC1954 (ATCC, CRL-2338), en el que se conjuga una sustancia citotóxica con el anticuerpo, y en el que la sustancia citotóxica es un derivado de maitansinoide seleccionado de DM1, DM3 o DM4 o un derivado de auristatina seleccionado de MMAE o MMAF. Otras realizaciones ventajosas de la presente invención se definen en las reivindicaciones dependientes.

La presente divulgación proporciona además un método para destruir células que expresan altamente cadherina en un paciente que comprende administrar el anticuerpo o el agente citotóxico de la presente invención a un paciente con una alta expresión de cadherina. Además, la presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de enfermedad con una alta expresión de cadherina, que comprende administrar el anticuerpo o el agente citotóxico de la presente invención a un paciente con una alta expresión de cadherina.

Además, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención para la producción de un agente citotóxico. Además, la presente invención proporciona el uso del anticuerpo de la presente invención para la producción de un agente terapéutico para enfermedades con una alta expresión de cadherina.

Efectos de la invención

El anticuerpo anti-cadherina de la presente invención reconoce el dominio de cadherina 1 (EC1) de cadherina y tiene una alta capacidad de internalización. Un anticuerpo capaz de ejercer una alta capacidad de internalización es útil para la preparación de un anticuerpo modificado y diseñado por ingeniería genética. Por ejemplo, un fármaco que ejerce toxicidad en una célula se une al anticuerpo anti-cadherina de la presente invención, y el resultante se administra a un paciente que tiene células cancerosas que expresan cadherina. Por tanto, pueden esperarse efectos antitumorales potentes. Específicamente, el anticuerpo anti-cadherina de la presente invención es útil como agente anticanceroso. Según la presente invención, se proporciona un complejo inmunitario que comprende el anticuerpo y un agente quimioterápico unido al mismo por medio de un ligador. Este complejo inmunitario presenta citotoxicidad más potente sobre líneas de células cancerosas que expresan cadherina, en comparación con un anticuerpo al que no se ha unido un agente quimioterápico. Por consiguiente, pueden esperarse efectos antitumorales potentes para la administración del complejo inmunitario a un paciente que tiene células cancerosas que expresan cadherina. Específicamente, el complejo inmunitario de la presente invención es útil como agente anticanceroso.

Breve descripción de los dibujos

[Figura 1] La figura 1 muestra secuencias de proteínas de maduración de CDH1 (E-cadherina), CDH2 (N-cadherina), y CDH3 (P-cadherina) de la que se han eliminado las secuencias de propéptido y señal.

[Figura 2] La figura 2 muestra el mecanismo de adhesión de moléculas que pertenecen a la familia de cadherinas clásicas.

[Figura 3] La figura 3 muestra los resultados de ARNm de CDH3 humano expresado en diversos tipos de tejidos tumorales (A: tejidos normales; B: diversos tipos de tejidos con cáncer; y C: el grado de diferenciación de células cancerosas pancreáticas).

[Figura 4] La figura 4 muestra los resultados de la inmunotinción de CDH3 humano en diversos tipos de tejidos tumorales.

[Figura 5] La figura 5 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo basados en la reacción de líneas celulares forzadas a expresar CDH3 humano y un anticuerpo anti-CDH3 humano disponible comercialmente (A: células CHO; B: células CHO forzadas a expresar CDH3 humano; a: anticuerpo anti-CDH3 humano 0,01 mg/ml; b: anticuerpo anti-CDH3 humano 0,1 mg/ml; y c: anticuerpo anti-CDH3 humano 1 mg/ml).

[Figura 6] La figura 6 muestra los resultados de análisis de citometría de flujo típicos basados en la reacción de 3 ejemplos de anticuerpos obtenidos y diversas líneas celulares (A: células CHO forzadas a expresar CDH3 humano;

B: células CHO; C: línea celular de cáncer de pulmón NCI-H358; a: anticuerpo anti-CDH3 humano 0,01 mg/ml; b: anticuerpo anti-CDH3 humano 0,1 mg/ml; y c: anticuerpo anti-CDH3 humano 1 mg/ml).

[Figura 7] La figura 7 muestra la capacidad de internalización del anticuerpo de ratón anti-CDH3 humano y la viabilidad de células humanas que expresan CDH3 a las que se les han administrado diversos tipos de anticuerpos y el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con saporina (en relación con la viabilidad celular (100 %) lograda sin la adición de anticuerpos). Se llevaron a cabo ensayos múltiples veces cambiando los tipos de anticuerpos administrados (A y B).

[Figura 8] La figura 8 muestra los dominios extracelulares de CDH3 humano correspondientes a los fragmentos de proteína parciales 1 a 5 de CDH3 humano.

[Figura 9] La figura 9 muestra los resultados de la expresión proteína parcial de CDH3 humano (A: fragmento 1; B: fragmento 2; C: fragmento 3; D: fragmento 4; y E: fragmento 5).

[Figura 10] La figura 10 muestra las reacciones de proteínas parciales de CDH3 humano y diversos anticuerpos analizados mediante inmunotransferencia de tipo Western (A: fragmento 1; B: fragmento 2; C: fragmento 3; D: fragmento 4; y E: fragmento 5).

[Figura 11] La figura 11 muestra los resultados del análisis de epítomos de PPAT-055-13 usando un alineamiento de péptidos. Un valor numérico en el eje X indica el número de un péptido en un alineamiento de péptidos (A: PPAT-055-13; B: en ausencia de anticuerpo primario).

[Figura 12] La figura 12 muestra la estructura de DM1SMe.

[Figura 13] La figura 13 muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad del conjugado de anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano-fármaco *in vitro* (ADC: un clon del anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano al que se le ha unido un fármaco; Desnudo: el anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano).

[Figura 14] La figura 14 muestra los resultados del análisis de tinción inmunohistológica de CDH3 humano expresado en una masa tumoral formada por medio de trasplante de la línea celular HCC1954 en un ratón.

[Figura 15] La figura 15 muestra los resultados de la prueba de citotoxicidad del conjugado de anticuerpo quimérico frente a CDH3 humano-fármaco *in vivo* (un clon del anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano al que se le ha unido un fármaco; Desnudo: el anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano no conjugado; Vehículo: lisado de anticuerpo).

Realizaciones para llevar a cabo la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en mayor detalle.

El anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo anti-cadherina que reconoce el dominio de cadherina 1 (EC1) de cadherina y tiene una alta capacidad de internalización.

En esta descripción, el dominio de cadherina 1 (EC1), el dominio de cadherina 2 (EC2), el dominio de cadherina 3 (EC3), el dominio de cadherina 4 (EC4) y el dominio de cadherina 5 (EC5) de P-cadherina (CDH3), E-cadherina (CDH1) y N-cadherina (CDH2) representan cada uno dominios descritos a continuación. Los correspondientes dominios de otras cadherinas pueden determinarse comparando secuencias de proteína de cadherina conocidas obtenidas de Genbank u otras instituciones. Puede llevarse a cabo la comparación de secuencias usando un programa conocido, tal como ClustalW2 (Thompson, J. D. *et al.*, Nucleic Acids Research 22 (22): 3673-3680, 1994) o ClustalX2 (Thompson, J. D. *et al.*, Nucleic Acids Research 25 (24): 4876-4882, 1997).

P-cadherina (CDH3)

Dominio de cadherina 1 (EC1): posiciones 108 a 236 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2

Dominio de cadherina 2 (EC2): posiciones 237 a 348 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2

Dominio de cadherina 3 (EC3): posiciones 349 a 461 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2

Dominio de cadherina 4 (EC4): posiciones 462 a 550 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2

Dominio de cadherina 5 (EC5): posiciones 551 a 654 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 2

E-cadherina (CDH1)

Dominio de cadherina 1 (EC1): posiciones 155 a 283 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4

Dominio de cadherina 2 (EC2): posiciones 284 a 395 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4

Dominio de cadherina 3 (EC3): posiciones 396 a 507 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4

Dominio de cadherina 4 (EC4): posiciones 508 a 597 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4

Dominio de cadherina 5 (EC5): posiciones 598 a 704 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 4

N-cadherina (CDH2)

Dominio de cadherina 1 (EC1): posiciones 160 a 288 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6

Dominio de cadherina 2 (EC2): posiciones 289 a 402 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6

Dominio de cadherina 3 (EC3): posiciones 403 a 518 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6

Dominio de cadherina 4 (EC4): posiciones 519 a 607 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6

Dominio de cadherina 5 (EC5): posiciones 608 a 719 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 6

La capacidad de internalización del anticuerpo puede someterse a ensayo según una técnica conocida. Por ejemplo, se conocen un método que comprende marcar un anticuerpo (o un anticuerpo secundario) con RI, un colorante fluorescente u otra sustancia y someter a ensayo el nivel de incorporación de marcador (intensidad de fluorescencia y RI) y un método para someter a ensayo la muerte celular usando una toxina tal como saporina (por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con saporina). Desde el punto de vista de la sensibilidad y la conveniencia, un método que implica el uso de un anticuerpo marcado con una toxina saporina es superior a otras técnicas. Los valores numéricos que indican los grados de capacidad de internalización usados en el presente documento se determinan en las condiciones descritas en el ejemplo 6 o 15. Específicamente, la capacidad de internalización se somete a ensayo de la siguiente manera.

(1) Ensayo de la capacidad de internalización

El anticuerpo anti-CDH3 humano (100 ng) y el anticuerpo marcado con saporina (100 ng, Advanced Targeting Systems, Inc.) se añadieron a las células que expresan CDH3 humano, y los resultados se calentaron en un incubador a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ durante 3 días. Después de eso, se evaluó la actividad de un anticuerpo para determinar la destrucción celular usando un reactivo de recuento de células viables (Cell Counting Kit-8, DOJINDO LABORATORIES, Inc.). Se expresó la actividad de destrucción celular en relación con una viabilidad celular del 100 % lograda sin la adición de anticuerpo.

En la presente invención, "alta capacidad de internalización" se refiere a que la viabilidad de células que expresan CDH3 a las que se les han administrado el anticuerpo de interés y el anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con saporina (representado en relación con una viabilidad celular del 100 % lograda sin la adición de anticuerpo), es preferiblemente del 70 % o menos, más preferiblemente del 60 % o menos, más preferiblemente del 50 % o menos, más preferiblemente del 45 % o menos, además preferiblemente del 40 % o menos y de manera particularmente preferible del 35 % o menos.

Es preferible que el anticuerpo de la presente divulgación reconozca una cadherina clásica. Los ejemplos de la misma incluyen, pero no se limitan a, E-cadherina, N-cadherina y P-cadherina.

Como antígeno usado para la preparación del anticuerpo de la presente divulgación puede usarse cadherina o un péptido parcial de la misma. Un ejemplo de la misma es, pero no se limita a, una proteína CDH3 soluble.

El anticuerpo de la presente divulgación puede ser un anticuerpo policlonal o monoclonal. El anticuerpo (policlonal o monoclonal) de la presente divulgación puede prepararse mediante cualquier técnica. Las técnicas para preparar tal anticuerpo se conocen bien en la técnica (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). El término "anticuerpo monoclonal" usado en el presente documento no se limita a un anticuerpo preparado mediante una técnica de hibridoma. El término "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo que se origina a partir de un único clon (por ejemplo, un clon de un eucariota, procariota o fago), y tal anticuerpo puede prepararse mediante cualquier método. El anticuerpo monoclonal de la presente invención puede prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos de las mismas incluyen un método de hibridoma, un método de recombinación, un método de presentación en fago y una combinación de cualquiera de los mismos. Todos de los mismos están dentro del alcance de la presente invención.

(a) Preparación de anticuerpo policlonal

Con el fin de preparar un anticuerpo policlonal, se administra cadherina, el producto de expresión del dominio extracelular de cadherina o un péptido parcial de la misma (preferiblemente EC1), como antígeno, a un animal mamífero, tal como una rata, ratón o conejo. La cantidad del antígeno que va a administrarse por animal es de 0,1 a 100 mg cuando no se usa adyuvante, y es de 1 a 100 µg cuando se usa un adyuvante. Los ejemplos de adyuvante incluyen adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA) y adyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización se lleva a cabo principalmente por medio de inyección intravenosa, hipodérmica o intraperitoneal. El intervalo entre dos casos de inmunización no está particularmente limitado, y la inmunización se lleva a cabo al intervalo de varios días a varias semanas, y preferiblemente al intervalo de 2 a 5 semanas de 1 a 10 veces, y preferiblemente de 2 a 5 veces. El título de anticuerpo se somete a ensayo por medio de inmunoensayo enzimático (ELISA), radioinmunoensayo (RIA) u otras técnicas de 6 a 60 días tras el caso de inmunización final, y la muestra de sangre se recoge el día que se somete a ensayo el título de anticuerpo máximo con el fin de obtener antisuero. Si es necesario, puede purificarse un anticuerpo a partir del antisuero mediante una técnica conocida seleccionada adecuadamente de entre, por ejemplo, precipitación con sales con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad. Alternativamente, cualquiera de estas técnicas puede realizarse en combinación adecuada.

(b) Preparación de anticuerpo monoclonal

Con el fin de preparar un anticuerpo monoclonal, se administra cadherina, un producto de expresión del dominio extracelular de cadherina, o un péptido parcial de la misma (preferiblemente EC1), como antígeno, a un animal mamífero, tal como una rata, ratón o conejo. La cantidad del antígeno que va a administrarse por animal es de 0,1 a 100 mg cuando no se usa adyuvante, y es de 1 a 100 µg cuando se usa un adyuvante. Los ejemplos de adyuvante incluyen adyuvante completo de Freund (FCA), adyuvante incompleto de Freund (FIA) y adyuvante de hidróxido de aluminio. La inmunización se lleva a cabo principalmente por medio de inyección intravenosa, hipodérmica o intraperitoneal. El intervalo entre dos casos de inmunización no está particularmente limitado, y la inmunización se lleva a cabo al intervalo de varios días a varias semanas, y preferiblemente al intervalo de 2 a 5 semanas de 1 a 10 veces, y preferiblemente de 2 a 5 veces. Las células productoras de anticuerpos se recogen de 1 a 60 días, y preferiblemente de 1 a 14 días tras el caso de inmunización final. Los ejemplos de las células productoras de anticuerpos incluyen células de bazo, células de ganglios linfáticos y células de sangre periférica, siendo preferibles células de bazo y células de ganglios linfáticos locales.

Con el fin de obtener células de hibridoma de fusión, se someten células productoras de anticuerpos y células de mieloma a fusión celular. Como células de mieloma que van a fusionarse con las células productoras de anticuerpos, pueden usarse líneas celulares establecidas generalmente disponibles de animales tales como ratones. Las líneas celulares tienen preferiblemente propiedades tal como sigue. Es decir, son preferibles las líneas celulares que tienen selectividad para fármacos que no pueden sobrevivir en medio de selección HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina) en un estado sin fusión y solo pueden sobrevivir en un estado en el que la célula se fusiona con las células productoras de anticuerpos. Los ejemplos de células de mieloma incluyen células de mieloma de ratón, tales como P3363-Ag.8.U1 (P3U1) y NS-1.

Posteriormente, las células de mieloma y las células productoras de anticuerpos se someten a fusión celular. La fusión celular se lleva a cabo en un medio para el cultivo de células animales, tal como medio RPMI-1640 o DMEM libre de suero, mezclando las células productoras de anticuerpos (de 1×10^6 a 1×10^7 células/ml) y las células de mieloma (de 2×10^5 a 2×10^6 células/ml) (la razón de las células productoras de anticuerpos con respecto a las células de mieloma es preferiblemente de 5:1) en presencia de un promotor de la fusión celular. Un ejemplo de un promotor de la fusión celular que puede usarse es polietilenglicol que tiene el peso molecular promedio de 1000 a 6000 Da. Alternativamente, puede usarse un aparato de fusión celular disponible comercialmente que utiliza estimulación eléctrica (por ejemplo, electroporación) para permitir que las células productoras de anticuerpos se fusionen con las células de mieloma.

Se seleccionan hibridomas de interés de las células que se han sometido a fusión celular. Para este fin, se diluye adecuadamente una suspensión celular con medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal, el resultante se aplica a una placa de microtitulación a la densidad celular de aproximadamente 3×10^5 células/pocillo, se añade un medio de selección a cada pocillo, y entonces se realiza el cultivo mientras se intercambia adecuadamente el medio de selección. Como resultado, las células hechas crecer aproximadamente 14 días tras el inicio del cultivo en el medio de selección pueden obtenerse como hibridomas.

Posteriormente, el sobrenadante de cultivo de los hibridomas hechos crecer se examina para detectar el anticuerpo diana. La selección de hibridomas puede llevarse a cabo según una técnica convencional, sin limitación particular. Por ejemplo, parte del sobrenadante de cultivo contenido en los pocillos que contienen las células hechas crecer como hibridomas se muestrea, y pueden llevarse a cabo inmunoensayos enzimáticos, radioinmunoensayos, o similares para examinar hibridomas que producen anticuerpos que se unen al dominio de cadherina 1 (EC1). Se someten las células de fusión a clonación por medio de dilución limitante u otros medios, y pueden establecerse al final células de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales.

Pueden recogerse anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas establecidos mediante, por ejemplo, una

técnica de cultivo celular convencional o recogida de fluido ascítico. Según una técnica de cultivo celular, se cultivan hibridomas en un medio para cultivo de células animales tal como medio RPMI-1640 que contiene suero bovino fetal al 10 %, medio MEM o medio libre de suero en condiciones de cultivo generales (por ejemplo, a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂) durante de 7 a 14 días, y se obtienen anticuerpos a partir del sobrenadante de cultivo.

Cuando van a recogerse anticuerpos monoclonales por medio de recogida de fluido ascítico, se administran por vía intraperitoneal aproximadamente 1×10^7 células de hibridoma a animales de la misma especie que el animal mamífero del que se obtienen células de mieloma, con el fin de permitir que crezcan grandes cantidades de células de hibridoma. El fluido ascítico se muestrea de 1 a 2 semanas después de eso. Si el método para recoger anticuerpos descrito anteriormente requiere purificación de anticuerpos, puede llevarse a cabo mediante una técnica conocida seleccionada adecuadamente de entre, por ejemplo, precipitación con sales con sulfato de amonio, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel y cromatografía de afinidad. Alternativamente, cualquiera de estas técnicas puede realizarse en combinación adecuada.

El anticuerpo de la presente divulgación no está particularmente limitado. Por ejemplo, puede usarse un anticuerpo de ratón, anticuerpo humano, anticuerpo de rata, anticuerpo de conejo, anticuerpo de oveja, anticuerpo de camello, anticuerpo de ave o un anticuerpo recombinante de gen modificado artificialmente previsto para disminuir la heteroantigenidad contra el ser humano, tal como anticuerpo quimérico o anticuerpo humanizado. Puede producirse un anticuerpo recombinante de gen mediante una técnica conocida. Un anticuerpo quimérico se compone de las regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de un animal mamífero no humano, tal como un anticuerpo de ratón, y las regiones constantes de cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo humano. Tal anticuerpo puede obtenerse uniendo ADN que codifica una región variable del anticuerpo de ratón a ADN que codifica una región constante del anticuerpo humano, insertando el resultante en un vector de expresión e introduciendo el vector de expresión en una célula huésped. Un anticuerpo humanizado se prepara trasplantando una región determinante de complementariedad (CDR) de un animal mamífero no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en la región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano, y se ha conocido para ello una técnica de recombinación génica general. Específicamente, se sintetiza una secuencia de ADN que está diseñada para unir una CDR de un anticuerpo de ratón a una región de entramado (FR) de un anticuerpo humano por medio de PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados para que tengan regiones solapantes en los extremos terminales. El ADN obtenido se une a un ADN que codifica para una región constante de un anticuerpo humano, el resultante se inserta en un vector de expresión y el vector de expresión se introduce entonces en una célula huésped. Por tanto, se prepara un anticuerpo humanizado (por ejemplo, documentos EP 239400 y WO 96/02576).

CH de un anticuerpo humanizado quimérico puede ser una inmunoglobulina humana de cualquier tipo (a continuación en el presente documento, denominada "hlg"), CH de la clase hlgG es preferible, y puede usarse cualquiera de las subclases hlgG1, hlgG2, hlgG3 y hlgG4 de la clase hlgG. CL de un anticuerpo humanizado quimérico puede ser cualquier hlg, y puede usarse la de la clase κ o λ .

El anticuerpo humanizado con CDR trasplantadas se prepara trasplantando las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano en posiciones adecuadas de la VH y la VL de un anticuerpo humano.

El anticuerpo humanizado con CDR trasplantadas puede prepararse construyendo ADNc que codifica una región V que resulta del trasplante de las secuencias de aminoácidos de las CDR de VH y VL de un anticuerpo de animal no humano que reacciona específicamente con cadherina en las FR de VH y VL de cualquier anticuerpo humano, insertando los resultantes en un vector de expresión de célula animal que tiene ADN que codifica CH y CL del anticuerpo humano para construir un vector que expresa el anticuerpo humanizado con CDR trasplantadas, e introduciendo y expresando el resultante en una célula animal.

Muchas células huésped productoras de anticuerpos que se usan para la expresión de proteínas se originan a partir de animales mamíferos. La célula huésped específica que es la más óptima para el producto de expresión génica de interés puede determinarse preferentemente. Los ejemplos de células huésped generales incluyen, pero no se limitan a, la línea celular que se origina a partir de la célula CHO (célula de ovario de hámster chino), la CV1 (célula de riñón de mono), COS (un derivado de CV1 que alberga el antígeno T de SV40), SP2/0 (célula de mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (célula de mieloma de ratón), 293 (célula de riñón humano) y 293T (un derivado de 293 que alberga el antígeno T de SV40). Pueden obtenerse células huésped de instituciones comerciales, la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) o una organización que ha publicado un documento relevante.

Una célula huésped preferible es o bien la línea celular deficiente en DGFR que se origina a partir de la célula CHO, o bien SP2/0 (véase Urland, G. *et al.*, Effect of gamma rays at the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions, *Somat. Cell. Mol. Genet.* Vol. 12, 1986, págs. 5555-566; y Schulman, M. *et al.*, A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies, *Nature*, vol. 276, 1978, págs. 269-270). La célula huésped más preferible es la célula CHO deficiente en DGFR.

Puede transfectarse un plásmido en una célula huésped mediante cualquier técnica. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, transfección (incluyendo el método de fosfato de calcio, el método de DEAE, lipofección

y electroporación), un método que comprende introducción de ADN con el uso de una envuelta tal como el virus Sendai, microinyección e infección usando un vector de virus tal como un vector de retrovirus o adenovirus (véase Current Protocols in Molecular Biology, capítulo 9: Introduction of ADN into Mammalian Cells, John Wiley and Sons, Inc.). La introducción de un plásmido en una célula huésped por medio de electroporación es lo más preferible.

Un ejemplo de otra técnica para preparar un anticuerpo quimérico o humanizado es un método en el que las interacciones entre CDR y residuos de entramado se modelan con el fin de identificar residuos de entramado importantes para la unión a antígeno, y se comparan secuencias para identificar residuos de entramado poco comunes ubicados en posiciones específicas (por ejemplo, Queen *et al.*, patentes estadounidenses n.ºs 5.530.101, 5.585.089, 5.693.761, 5.693.762 y 6.180.370). Los anticuerpos pueden humanizarse mediante una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Los ejemplos de tales técnicas incluyen injerto de CDR (patente europea n.º 239.400; publicación internacional PCT WO 91/09967; y patentes estadounidense n.ºs 5.225.539, 5.530.101 y 5.585.089), remodelación de superficie o rechapado (patentes europeas n.ºs 592.106 y 519.596; Padlan, Mol. Immunol., vol. 28, págs. 489 a 498, 1991; Studnicka *et al.*, Prot. Eng., vol. 7, págs. 805 a 814, 1994; Roguska *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., vol. 91, págs. 969 a 973, 1994) e intercambio de cadenas (patente estadounidense n.º 5.565.332). Se describe un método para preparar un anticuerpo quimérico en Molecular Biotechnology 26, 39, 2004 y Journal of Immunological Methods 125, 191, 1989.

Es preferible que la secuencia de aminoácidos del anticuerpo quimérico o humanizado sea completamente idéntica a la secuencia de aminoácidos de la región VH o VL que se origina a partir de ADNc expresado por el hibridoma depositado. Un anticuerpo que tiene una secuencia que presenta el 90 % o más de identidad como resultado de ingeniería genética también es preferible. En el transcurso de la humanización o quimerización, el ajuste de la sustitución de residuos se ha realizado hasta ahora dirigido a la mejora de la unión a antígeno puesto que tal anticuerpo con una secuencia parcialmente modificada se considera que se deriva fundamentalmente del hibridoma original.

Se han conocido técnicas para preparar un anticuerpo humanizado o quimérico por medio de ingeniería genética. Específicamente, las secuencias de VH y VL del anticuerpo monoclonal original se modifican por ingeniería genética y luego se quimerizan o humanizan según una técnica convencional.

También se conoce un método para obtener un anticuerpo humano. Por ejemplo, se someten linfocitos humanos a sensibilización con antígenos de interés o con células que expresan antígenos de interés *in vitro*, los linfocitos sensibilizados se fusionan con células de mieloma humanas tales como células U266, y entonces puede obtenerse un anticuerpo humano de interés que tiene actividad de unión a un antígeno (véase la publicación de patente japonesa (Kokoku) n.º H01-59878 B (1989)). Alternativamente, un animal transgénico que tiene todo el repertorio de genes de anticuerpos humanos puede inmunizarse con un antígeno de interés para obtener un anticuerpo humano de interés (véanse los documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Además, se ha conocido una técnica para obtener un anticuerpo humano por medio de cribado usando bibliotecas de anticuerpos humanos. Por ejemplo, se expresa una región variable de anticuerpo humano sobre la superficie de un fago mediante el método de presentación en fago como anticuerpo de cadena sencilla (scFv), y puede seleccionarse un fago que se une a antígeno. El gen del fago seleccionado puede analizarse para determinar la secuencia de ADN que codifica para una región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Tras la dilucidación de la secuencia de ADN de scFv que se une a antígeno, puede prepararse un vector de expresión adecuado basándose en tal secuencia y entonces puede obtenerse un anticuerpo humano. Tales técnicas se han conocido bien en la técnica. Véanse los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

Tal anticuerpo puede ser monovalente, divalente o polivalente, siempre que reconozca un dominio de cadherina 1 (EC1) de cadherina y mantenga una alta capacidad de internalización. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo de bajo peso molecular tal como un fragmento de anticuerpo, o un anticuerpo modificado. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, dsFv y un péptido que comprende CDR. Alternativamente, se fusiona una región Fc con un fragmento de anticuerpo o un anticuerpo de bajo peso molecular, tal como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, scFv (Fv de cadena sencilla) o diacuerpo, para proporcionarle actividad de ADCC. Con el fin de lograr tal anticuerpo, puede construirse un gen que codifica para tal anticuerpo, el resultante puede introducirse en un vector de expresión, y el resultante puede incorporarse en el vector de expresión y puede expresarse en una célula huésped adecuada.

Entre los fragmentos obtenidos procesando IgG con una proteasa, papaína (cortada en el aminoácido 224 de la cadena H), Fab es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 000 y que tiene actividad de unión a antígeno, que se compone de aproximadamente una mitad del lado N-terminal de la cadena H unida a la cadena L completa a través de un enlace disulfuro.

Puede obtenerse Fab de la presente invención procesando un anticuerpo que reacciona específicamente con cadherina, con una proteasa, papaína. Alternativamente, puede insertarse ADN que codifica para Fab del anticuerpo en un vector de expresión procariota o eucariota, y el vector puede introducirse y expresarse en un procariota o eucariota. Por tanto, puede prepararse Fab.

Entre los fragmentos obtenidos procesando IgG con una proteasa, pepsina (cortada en el aminoácido 234 de la cadena

H), $F(ab')_2$ es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 100 000 y que tiene actividad de unión a antígeno, que es algo más grande que el producto obtenido uniendo dos Fab por medio de un enlace disulfuro de la región de bisagra.

5 Puede obtenerse $F(ab')_2$ de la presente invención procesando un anticuerpo que reacciona específicamente con cadherina, con una proteasa, pepsina. Alternativamente, puede prepararse uniendo dos Fab' descritos a continuación por medio de tioéter o disulfuro.

10 Fab' es un fragmento de anticuerpo que tiene un peso molecular de aproximadamente 50 000 y que tiene actividad de unión a antígeno que resulta de la escisión de un enlace disulfuro de $F(ab')_2$ de la región de bisagra mencionada anteriormente.

15 Puede obtenerse Fab' de la presente invención procesando $F(ab')_2$ que reacciona específicamente con cadherina, con un agente reductor, ditiotritol. Alternativamente, puede insertarse ADN que codifica el fragmento Fab' del anticuerpo en un vector de expresión procariota o eucariota, y el vector puede introducirse en un procariota o eucariota para expresar Fab' en el mismo. Por tanto, puede prepararse Fab'.

20 "scFv" indica un polipéptido VH-P-VL o VL-P-VH compuesto por una única VH unida a una única VL por medio de un ligador peptídico adecuado (en el presente documento denominado "P"). VH y VL incluidas en el scFv de la presente invención pueden derivarse del anticuerpo de la presente invención que reacciona específicamente con cadherina, tal como un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

25 El scFv de la presente invención puede prepararse obteniendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo que reacciona específicamente con cadherina, construyendo ADN que codifica scFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar scFv en el mismo.

30 "dsFv" se obtiene uniendo los polipéptidos cuando un único residuo de aminoácido en VH y VL se sustituye por un residuo de cisteína entre sí por medio de un enlace disulfuro entre los residuos de cisteína. Los residuos de aminoácido que van a sustituirse por residuos de cisteína pueden seleccionarse según el método de Reiter *et al.* (Protein Engineering, 7, 697, 1994) basándose en la predicción de la conformación del anticuerpo. VH y VL incluidos en el dsFv de la presente invención pueden derivarse del anticuerpo de la presente invención que reacciona específicamente con cadherina tal como un anticuerpo humanizado o humano.

35 El fragmento dsFv de la presente invención puede prepararse obteniendo ADNc que codifica VH y VL de un anticuerpo que reacciona específicamente con cadherina, construyendo ADN que codifica dsFv, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar dsFv en el mismo.

40 Un péptido que comprende CDR se compone de al menos uno de la CDR de cadena H o L. Puede unirse una pluralidad de CDR directamente entre sí o por medio de un ligador peptídico adecuado.

45 El péptido que comprende CDR de la presente invención puede prepararse obteniendo ADNc que codifica VH y VL del anticuerpo que reacciona específicamente con cadherina, construyendo ADN que codifica CDR, insertando el ADN en un vector de expresión procariota o eucariota e introduciendo el vector en un procariota o eucariota para expresar tal péptido en el mismo.

El péptido que comprende CDR también puede producirse por medio de síntesis química, tal como el método de Fmoc (fluorenilmetiloxycarbonilo) o el método de tBoc (*t*-butiloxycarbonilo).

50 Como anticuerpo modificado, puede usarse también un anticuerpo conjugado con una molécula variada, tal como polietilenglicol (PEG). Un anticuerpo conjugado con fármaco es particularmente útil. Tal anticuerpo modificado puede obtenerse sometiendo un anticuerpo a modificación química. Se conoce en la técnica un método de modificación de anticuerpos.

55 El anticuerpo de la presente invención ejerce una alta capacidad de internalización. Por tanto, puede conjugarse una toxina con el mismo, y el resultante puede usarse en forma de un agente citotóxico. El agente citotóxico de la presente invención puede ponerse en contacto con, por ejemplo, células cancerosas que expresan cadherina, de modo que el agente puede dañar las células cancerosas.

60 Según una realización preferible de la presente invención, el anticuerpo es un denominado ADC que comprende un anticuerpo y una sustancia citotóxica tal como un fármaco conjugado con el mismo.

65 Los ejemplos de fármacos que pueden usarse en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, duocarmicina, un análogo de duocarmicina, un derivado de duocarmicina, CC-1065, un análogo de duocarmicina compuesto principalmente por CBI, un análogo de duocarmicina compuesto principalmente por MCBI, un análogo de duocarmicina compuesto principalmente por CCBI, doxorubicina, un conjugado de doxorubicina, morfolino-doxorubicina,

cianomorfolino-doxorubicina, dolastatina, dolestatina-10, combretastatina, caliqueamicina, maitansina, un análogo de maitansina, DM1, DM2, DM3, DM4, DMI, auristatina E, auristatina EB (AEB), auristatina EFP (AEFP), monometilauristatina E (MMAE), monometilauristatina F (MMAF), éster AE del ácido 5-benzoilvalérico (AEVB), tubulisina, disorazol, epotilona, paclitaxel, docetaxel, SN-38, topotecán, rizoxina, equinomicina, colcicina, vinblastina, vindesina, estramustina, cemadotina, eleuterobina, metotrexato, metopterina, o 5-fluorouracilo, 6-mercaptopurina, arabinósido de citosina, melfalán, leurosina, leurosideína, actinomicina, daunorubicina, un conjugado de daunorubicina, mitomicina C, mitomicina A, carminomicina, aminopterina, talisomicina, podofilotoxina, un derivado de podofilotoxina, etopósido, fosfato de etopósido, vincristina, taxol, taxotere, ácido retinoico, ácido butírico, *N*⁸-acetilpermidina y camptotecina.

El ADC usado en la presente invención puede prepararse uniendo el fármaco mencionado anteriormente a un anticuerpo según una técnica convencional. Un anticuerpo y un fármaco pueden unirse directamente entre sí por medio de sus propios grupos ligadores o indirectamente por medio de un ligador a otra sustancia.

Un fármaco puede unirse directamente a un anticuerpo por medio de un enlace disulfuro entre SH o por medio de grupos maleimida. Por ejemplo, el enlace disulfuro intramolecular en la región Fc de un anticuerpo y el enlace disulfuro de un fármaco pueden reducirse, y el fármaco puede unirse al anticuerpo por medio de un enlace disulfuro. Alternativamente, pueden unirse entre sí por medio de maleimidas. Además, puede introducirse cisteína en un anticuerpo por medio de ingeniería genética.

Puede unirse un anticuerpo a un fármaco indirectamente por medio de otra sustancia (ligador). Un ligador comprende preferiblemente uno o más grupos funcionales que reaccionan con cualquiera o ambos del anticuerpo y el fármaco. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen grupos amino, carboxilo, mercapto, maleimida y piridinilo.

Los ejemplos de ligadores incluyen, pero no se limitan a, sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster *N*-succinimidílico del ácido κ -maleimidoundecanoico (KMUA), éster *N*-succinimidílico del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido ε -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzoyl-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPI), 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), *p*-aminobenciloxycarbonilo (PAB), *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) y *N*-succinimidil-(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB). También puede usarse un ligador peptídico tal como valina-citrulina (Val-Cit) o alanina-fenilalanina (ala-phe), y puede usarse cualquiera de los ligadores mencionados anteriormente en combinación adecuada.

Puede unirse un fármaco a un anticuerpo según el método descrito en, por ejemplo, Cancer Research, 68 (22) 9280, 2008, Nature Biotechnology, 26 (8) 925, 2008, Bio Conjugate Chemistry, 19, 1673, 2008, Cancer Research, 68 (15), 6300, 2008, o la publicación de patente japonesa (Kohyo) n.º 2008-516896 A.

Otra realización del conjugado de anticuerpo fármaco de la presente invención es una denominada "inmunotoxina" compuesta por un anticuerpo y una toxina unida a la misma químicamente o por medio de ingeniería genética.

Los ejemplos de toxinas que pueden usarse en la presente invención incluyen cadena A de toxina diftérica, endotoxina de *Pseudomonas*, cadena de ricina, cadena de ricina A desglicosilada, gelonina y saporina.

Otra realización del anticuerpo de la presente invención es un denominado "anticuerpo marcado con RI" compuesto por el anticuerpo de la presente invención y una sustancia radiactiva marcada con el mismo.

Cuando se usa una sustancia radiactiva en forma de un agente terapéutico contra el cáncer, es preferible un metal radiactivo citotóxico. Cuando se usa en forma de un agente de diagnóstico del cáncer, es preferible un metal no radiactivo no citotóxico. También pueden usarse yodo 123 (123I) o yodo 131 (131I).

Los ejemplos de metales radiactivos citotóxicos incluyen itrio 90 (90Y), renio 186 (186Re), renio 188 (188Re), cobre 67 (67Cu), hierro 59 (59Fe), estroncio 89 (89Sr), oro 198 (198Au), mercurio 203 (203Hg), plomo 212 (212Pb), disprosio 165 (165Dy), rutenio 103 (103Ru), bismuto 212 (212Bi), bismuto 213 (213Bi), holmio 166 (166Ho), samario 153 (153Sm) y lutecio 177 (177Lu).

Entre estos metales radiactivos, 90Y, 153Sm y 177Lu son particularmente preferibles desde el punto de vista de, por ejemplo, semivida, energía radiactiva, facilidad de marcaje, eficacia de marcaje o estabilidad de un complejo.

Los ejemplos de metales radiactivos no citotóxicos preferibles como agentes de diagnóstico incluyen, pero no se limitan a, tecnecio 99m (99mTc), indio 111 (111In), indio 113m (113mIn), galio 67 (67Ga), galio 68 (68Ga), talio 201 (201Tl), cromo 51 (51Cr), cobalto 57 (57Co), cobalto 58 (58Co), cobalto 60 (60Co), estroncio 85 (85Sr), mercurio 197 (197Hg) y cobre 64 (64Cu).

Con el fin de unir tal elemento de metal radiactivo al anticuerpo de la presente invención, es preferible que se permita que un reactivo quelante de metal reaccione con el anticuerpo y que se permita que el elemento de metal radiactivo reaccione con el mismo para formar un complejo. En el anticuerpo modificado así obtenido, se une un elemento de metal radiactivo al anticuerpo de la presente invención por medio de un reactivo quelante de metal.

Los ejemplos de reactivos quelantes de metales usados para la formación de un complejo de este tipo incluyen: (1) derivados de quinolina, tales como 8-hidroxiquinolina, 8-acetoxiquinolina, 8-hidroxiquinolina, sulfato de oxiquinolina, O-acetiloxina, O-benzoiloxina, O-*p*-nitrobenzoiloxina, y compuestos de quinolona que tienen un esqueleto de quinolina (por ejemplo, norfloxacin, ofloxacin, enoxacin, ciprofloxacino, lomefloxacino, tosfloxacino, fleroxacin y esparfloxacino); (2) compuestos, tales como ácido cloranílico, aluminón, tiourea, piogalol, cupferrón, bismutiol (II), ácido galoilgálico, tiolida, 2-mercaptobenzotiazol y cloruro de tetrafenilarsonio; (3) ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), y compuestos que tienen un esqueleto similar (dihidroxiethylglicina, ácido diaminopropanoltetraacético, ácido etilendiaminadiacético, clorhidrato de ácido etilendiaminadiopropiónico, ácido hidroxietilendiaminatriacético, etilendiaminatetrakis(ácido metilensulfónico), ácido glicol éter diaminatetraacético, ácido hexametilendiaminatetraacético, ácido hidroxietiliminodiacético, ácido iminodiacético, ácido diaminopropanotetraacético, ácido nitrilotriacético, ácido nitrilotripropiónico, sal de trisodio de nitrilotris(ácido metilensulfónico), ácido trietilentetraminahexaacético, metil-DTPA, ciclohexil-DTPA, aminobencil-EDTA, isotiocianobencil-EDTA, isotiocianobencil-DTPA, metilisotiocianobencil-DTPA, ciclohexilisotiocianobencil-DTPA, maleimidopropilamidobencil-EDTA, maleimidopentilamidobencil-EDTA, maleimidodecilamidobencil-EDTA, maleimidopentilamidobencil-DTPA, maleimidodecilamidobencil-EDTA y maleimidodecilamidobencil-DTPA); y (4) 1 ácido,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético (DOTA), ácido 1,4,7-triazaciclononano-1,4,7-triacético (NOTA), ácido 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano-1,4,8,11-tetraacético (TETA), 1,4,7,10-tetraazaciclododecano (Cyclen), 1,4,8,11-tetraazaciclotetradecano (Cyclam), isotiocianobencil-DOTA e isotiocianobencil-NOTA.

Entre estos reactivos quelantes de metales, son preferibles isotiocianobencil-DOTA, metilisotiocianobencil-DTPA y ciclohexilisotiocianobencil-DTPA desde el punto de vista de, por ejemplo, la facilidad de introducción de un quelato de metal en un anticuerpo, la eficacia de marcaje o la estabilidad de un complejo.

Un experto en la técnica sería capaz de unir un elemento de metal radiactivo al anticuerpo de la presente invención según una técnica convencional. Por ejemplo, se permite que un reactivo quelante de metal reaccione con el anticuerpo de la presente invención para preparar de ese modo un precursor de marcador de antemano, y entonces se permite que el precursor reaccione con un elemento de metal radiactivo.

El agente citotóxico de la presente invención puede contener adecuadamente un portador, un excipiente, un diluyente farmacéuticamente aceptable, o similar, según la necesidad, además del anticuerpo de la presente invención (al que puede unirse una sustancia citotóxica, incluyendo un fármaco, una toxina o una sustancia radioactiva, según la necesidad). El agente citotóxico de la presente invención puede prepararse en forma de una preparación de inyección, por ejemplo. La dosis del agente citotóxico de la presente invención varía dependiendo de los síntomas, la gravedad, la edad y el peso corporal de un paciente, la vía de administración u otros factores. El peso del anticuerpo como principio activo es generalmente de aproximadamente 10 ng a aproximadamente 100 mg/kg (peso corporal).

La composición farmacéutica de la presente invención es particularmente útil como agente terapéutico para enfermedades con alta expresión de cadherina (preferiblemente CDH3). Las enfermedades con alta expresión de cadherina (preferiblemente CDH3) no están particularmente limitadas, siendo preferibles cáncer. Los ejemplos de tales enfermedades incluyen cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de pulmón, cáncer de células de transición, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer renal, cáncer del tracto biliar, cáncer de la glándula tiroidea, cáncer de cabeza y cuello, cáncer esofágico, cáncer de células escamosas cutáneas, melanoma, cáncer gástrico, cáncer de próstata, osteosarcoma y sarcoma de tejidos blandos.

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe en mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos, aunque la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplos

Ejemplo 1: Expresión de ARNm de CDH3 humano en tejido normal y tejido canceroso

Se prepararon muestras de ARN total según una técnica convencional con el uso de Isogen (Nippon Gene) a partir de las muestras recogidas de tejidos humanos normales y diversos tipos de tejidos cancerosos por medio de microdissección por captura con láser. Se sometieron las muestras de ARN (10 ng cada una) a análisis de la expresión génica usando el instrumento GeneChipU-133B (Affymetrix, Inc.) según el Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix, Inc.). Se designó que el nivel de expresión promedio de todos los genes era 100, y se examinaron los genes que presentaban los niveles de expresión potenciados en células cancerosas. Como resultado, se encontró que la expresión de CDH3 humano estaba limitada en tejidos humanos normales, pero los niveles de expresión del mismo estaban potenciados en células de cáncer de pulmón, cáncer de colon y cáncer pancreático (figura 3A y 3B). Además, se examinó la expresión de ARNm de CDH3 en tejido de cáncer pancreático con diferentes grados de diferenciación. Como resultado, se encontró que los niveles de expresión del mismo eran altos en algunos tejidos,

independientemente de los grados de diferenciación (figura 3C).

Ejemplo 2: Expresión de proteína CDH3 humana en tejido canceroso analizada por medio de tinción inmunohistoquímica

Con el fin de inspeccionar la expresión de proteína CDH3 en muestras clínicas de cáncer, se llevó a cabo inmunotinción con el uso de alineamientos que contenían muestras de tejido canceroso.

Se usaron los alineamientos que contenían muestras de tejido de cáncer pancreático (cáncer glandular), cáncer de pulmón (cáncer glandular), cáncer de pulmón (cáncer de células escamosas) y cáncer de colon (cáncer glandular) obtenidos de Shanghai Outdo Biotech Co., Ltd.).

Se sometieron los portaobjetos de alineamientos de tejido a desparafinización y luego activación con Tris 10 mM y EDTA 1 mM (pH 9,0) a 95 °C durante 40 minutos. Tras inactivarse las peroxidasas endógenas con el uso de un reactivo de bloqueo incluido en el kit Envision+ (Dako), se permitió que las muestras reaccionaran con anticuerpo anti-CDH3 610227 5 µg/ml (BD Biosciences) o con anticuerpo anti-HBs Hyb-3423 5 µg/ml (un control negativo) a 4 °C durante la noche. Tras eliminarse por lavado la disolución de anticuerpo, se permitió que las muestras reaccionaran con un reactivo de anticuerpo secundario frente a polímero incluido en el kit Envision+ a temperatura ambiente durante 30 minutos. Entonces se sometieron las muestras a desarrollo del color usando un reactivo colorante incluido en el kit Envision+, y se realizó tinción nuclear con el uso de disolución de hematoxilina/eosina.

La figura 4 muestra los resultados. Mientras que las células cancerosas se tiñeron con el anticuerpo anti-CDH3 humano, las células normales no se tiñeron con el mismo.

Ejemplo 3: Establecimiento de una línea celular CHO que expresa CDH3 humano

Con el fin de obtener una línea celular para el examen de anticuerpos anti-CDH3, se estableció una línea celular CHO que expresa CDH3 de longitud completa.

(1) Producción de vector de expresión del gen de CDH3

Con el fin de insertar ADN de CDH3 de longitud completa tal como se muestra en SEQ ID NO: 1 en un vector de expresión de mamífero pEF4/myc-HisB (Invitrogen), se trató el ADN de CDH3 humano de longitud completa con dos enzimas de restricción KpnI (Takara Bio Inc.) y XbaI (Takara Bio Inc.) a 37 °C durante 1 hora. Después de eso, se insertó el fragmento así obtenido en pEF4/myc-HisB, que se había tratado con las mismas enzimas de restricción KpnI y XbaI, con el uso de ADN ligasa de T4 (Promega) según una técnica convencional. Por tanto, se obtuvo un vector de expresión (pEF4-CDH3-myc-His).

(2) Adquisición de una línea celular que expresa CDH3 estable

Según el protocolo de un reactivo de transfección FuGENE® 6 (Roche Diagnostics K.K.), se inocularon 8×10^5 células CHO en una placa de 10 cm de diámetro el día antes de la transfección, y se cultivaron las células durante la noche. Después de eso, se mezclaron 8 µg de un vector de expresión (pEF4-CDH3-myc-His) y 16 µl de un reactivo FuGENE 6 con 400 µl de medio RPMI 1640 libre de suero (Sigma-Aldrich), y se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió el resultante a la disolución de cultivo celular para la transfección. Dos días tras la transfección, se realizó la clonación a través de dilución limitante con el uso de un reactivo de selección (Zeocin®).

Se seleccionaron clones de células CHO que expresan CDH3 de longitud completa a través de inmunotransferencia de tipo Western con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Como resultado, se obtuvo una línea celular CHO (EXZ1501) forzada a expresar CDH3, que presenta un alto nivel de expresión y una alta capacidad de crecimiento. La línea celular obtenida, su cepa parental (es decir, CHO) y un anticuerpo anti-CDH3 comercialmente disponible (R&D Systems, Inc.) se sometieron a la reacción y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados se muestran en la figura 5.

Ejemplo 4: Producción de antígeno de dominio extracelular de CDH3 humano

Se produjo la proteína de dominio extracelular de CDH3 humano (sCDH3) que crece de la región transmembrana C-terminal y una región posterior a la misma para que sirviera como inmunógeno para la producción de un anticuerpo anti-CDH3 humano.

(1) Producción de vector de expresión de antígeno de sCDH3

Se realizó PCR con el uso de un ADNc de longitud completa de CDH3 humano como molde y un cebador directo (SEQ ID NO: 7: CGCGGTACCATGGGGCTCCCTCGT) y un cebador inverso (SEQ ID NO: 8: CCGTCTAGATAACCTCCCTTCCAGGGTCC), que se habían diseñado para amplificar un fragmento correspondiente

al dominio extracelular de CDH3 humano (1-654 en SEQ ID NO: 2, a continuación en el presente documento denominado ADNc de sCDH3). Se llevó a cabo la reacción con el uso de KOD-Plus (Toyobo Co., Ltd.) repitiendo un ciclo de 94 °C durante 15 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 68 °C durante 90 segundos 30 veces.

5 Después de eso, se escindió un fragmento de gel que contenía una banda de un tamaño objetivo (aproximadamente 2,0 kpb) por medio de electroforesis en gel de agarosa, y se obtuvo el ADNc de sCDH3 objetivo usando un kit de extracción de gel QIA® quick (QIAGEN K.K.).

10 Con el fin de insertar ADNc de sCDH3 en un vector de expresión pEF4/myc-HisB, se trató ADNc de sCDH3 con dos enzimas de restricción KpnI y XbaI. Entonces se insertó el fragmento así obtenido en pEF4/myc-HisB, que se había tratado con las mismas enzimas de restricción KpnI y XbaI, con el uso de ADN ligasa de T4 según una técnica convencional, y se obtuvo un vector de expresión pEF4-sCDH3-myc-His.

(2) Expresión de proteína CDH3 soluble

15 Según el protocolo de un reactivo de transfección FuGENE 6, se inocularon 8×10^5 células CHO en una placa de 10 cm el día antes de la transfección, y se cultivaron las células durante la noche. Después de eso, se mezclaron 8 µg de un vector de expresión pEF4-sCDH3-myc-His y 16 µl de un reactivo FuGENE 6 con 400 µl de medio RPMI 1640 libre de suero, y se permitió que la mezcla reposara a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se añadió la mezcla resultante a la disolución de cultivo celular para la transfección. Dos días tras la transfección, se llevó a cabo la clonación a través de dilución limitante con el uso de un reactivo de selección (Zeocin®).

25 Se seleccionaron células CHO que expresan CDH3 soluble por medio de inmunotransferencia de tipo Western con el uso de un anticuerpo monoclonal anti-c-Myc (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Se seleccionaron líneas celulares que presentan altos niveles de secreción en el sobrenadante de cultivo y alta proliferación para obtener líneas celulares CHO que expresan CDH3 soluble (EXZ1702). Se cultivaron las líneas celulares EXZ1702 seleccionadas durante 72 horas en tres botellas giratorias (cada área de cultivo: 1500 cm²) con medio libre de suero CHO-S-SFM-II (333 ml/botella) (Invitrogen), y se recuperaron los sobrenadantes de cultivo. Se sometieron los sobrenadantes de cultivo así obtenidos a cromatografía de afinidad por medio de la columna HisTrap® HP (GE Healthcare Biosciences Inc.) y cromatografía de filtración en gel por medio de una columna Superdex® 200 pg (GE Healthcare Biosciences Inc.). Por tanto, se obtuvo proteína de dominio extracelular de CDH3 soluble.

Ejemplo 5: Producción de anticuerpo monoclonal anti-CDH3 humano

35 (1) Producción de anticuerpo monoclonal usando proteína CDH3 soluble como inmunógeno

Se mezcló una disolución de 50 µg de proteínas CDH3 solubles en solución salina fisiológica con una cantidad igual de Titer-MAX Oro® (TiterMax, Inc.), y se inyectó la mezcla por vía intraperitoneal e hipodérmica en ratones MRL/lpr (Japan SLC Inc.) para la inmunización inicial. Se realizaron procedimientos de inmunización posteriores inyectando una mezcla preparada de manera similar de proteína CDH3 soluble (25 µg) y Titer-MAX Oro® por vía intraperitoneal e hipodérmica en los ratones. Tres días tras la inmunización final, se prepararon células de bazo a partir de los ratones en condiciones asépticas, y se fusionaron las células con células de mieloma de ratón SP2/O-Ag14 o P3-X63-Ag8.653 según una técnica convencional mediante el método de polietilenglicol).

45 (2) Selección de hibridoma que produce anticuerpos anti-CDH3 humano

Se realizó la selección de anticuerpos anti-CDH3 humano por medio de análisis de citometría de flujo con el uso de EXZ1501.

50 Específicamente, se retiró EXZ1501 de una placa de cultivo por medio de tratamiento de la misma con EDTA-PBS 2 mM y luego se suspendió en una disolución de FACS hasta una densidad celular de 1×10^6 células/ml. Se inoculó la suspensión celular en una placa de 96 pocillos hasta una densidad de 50 µl/pocillo, se añadió al mismo un sobrenadante de cultivo de hibridoma y se permitió que la reacción avanzara a 4 °C durante 60 minutos. Tras lavarse la placa dos veces con la disolución de FACS (200 µl/pocillo), se añadió a la misma F(ab')₂ de cabra anti-IgG de ratón marcado con Alexa Fluor 488 (Invitrogen), y se permitió que la reacción avanzara a 4 °C durante 30 minutos. Después de eso, se lavó la placa dos veces con la disolución de FACS, se realizó análisis de citometría de flujo y se seleccionaron los hibridomas que se observó que reaccionaban con EXZ1501.

60 La figura 6 muestra los resultados de reacciones típicas entre los anticuerpos obtenidos a partir de tales hibridomas y EXZ1501, su cepa celular parental (la célula CHO) o la línea celular de adenocarcinoma bronquiolo-alveolar humano (NCI-H358) en la que se observó un alto nivel de expresión de CDH3. Se encontró que todos los hibridomas seleccionados reaccionaban con EXZ1501 y NCI-H358; sin embargo, estas células no reaccionaban con la célula CHO.

65 Ejemplo 6: Evaluación de la capacidad de internalización del anticuerpo de ratón anti-CDH3 humano usando

anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con saporina (MabZAP)

Se sometió a ensayo la capacidad de internalización con el uso del anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con una toxina (saporina) que inhibe la síntesis de proteínas. La destrucción de células por la saporina implica siempre internalización celular. Por tanto, el grado en el que las células humanas que expresan CDH3 se destruyen por el anticuerpo anti-CDH3 humano puede someterse a ensayo usando MabZAP (Advanced Targeting Systems, Inc.) como anticuerpo secundario, y puede evaluarse la capacidad de internalización del anticuerpo anti-CDH3 humano.

Como células humanas que expresan CDH3, se usaron las células de cáncer de mama humano HCC1954 (5000 células/pocillo), se añadieron a las mismas 100 ng de los anticuerpos de ratón anti-CDH3 humano y 100 ng de MabZAP, y se calentó el resultante en un incubador a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ durante 3 días. Después de eso, se evaluó la actividad de un anticuerpo para la destrucción celular usando un reactivo de recuento de células viables (Cell Counting Kit-8, DOJINDO LABORATORIES, Inc.). Se expresó la actividad de destrucción celular en relación con una viabilidad celular del 100 % lograda sin la adición de anticuerpo. La tabla 1, figura 7A y figura 7B muestran los resultados de ensayos llevados a cabo múltiples veces usando diferentes anticuerpos.

[Tabla 1]

N.º de anticuerpo	Subtipo	Viabilidad celular (% prueba A)	Viabilidad celular (%, prueba B)
PPAT-055-01	IgG1	92	85
PPAT-055-02	IgG2a	31	42
PPAT-055-03	IgG1	34	50
PPAT-055-05	IgG1		69
PPAT-055-07	IgG2a		45
PPAT-055-08	IgG2a	43	40
PPAT-055-09	IgG1	26	57
PPAT-055-10	IgG1		61
PPAT-055-11	IgG1		59
PPAT-055-12	IgG2a	47	58
PPAT-055-13	IgG1	99	95
PPAT-055-14	IgG1		87
PPAT-055-15	IgG1	23	
PPAT-055-16	IgG1	88	89
PPAT-055-17	IgG1	93	87
PPAT-055-18	IgG1		65
PPAT-055-19	IgG2b	85	79
PPAT-055-20	IgG2a		78
PPAT-055-21	IgG2a		57
PPAT-055-24	IgG2a		44
PPAT-055-25	IgG1		54
Negativo Ab1	IgG2a		97
Negativo Ab2	IgG1	90	98

Negativo Ab1 y negativo Ab2 indican anticuerpos que reconocen antígenos que no se expresan en líneas celulares humanas y no relacionados con CDH3.

El hibridoma PPAT-055-03 que produce el anticuerpo PPAT-055-03 se depositó en el National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (2-5-8, Kazusakamatori, Kisarazushi, Chiba, 292-0818, Japón) con el número de registro: NITE P-988 el 15 de octubre de 2010 y se transfirió, con el número de registro: NITE BP-988, al depósito internacional según el Tratado de Budapest el 7 de septiembre de 2011.

Los hibridomas PPAT-055-09 y PPAT-055-24 que producen los anticuerpos PPAT-055-09 y PPAT-055-24 se depositaron en el National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (2-5-8, Kazusakamatori, Kisarazushi, Chiba, 292-0818, Japón) con los números de registro: NITE BP-989 y NITE BP-991, respectivamente, el 15 de octubre de 2010 y se transfirieron, con los números de registro: NITE BP-989 y NITE BP-991, respectivamente, al depósito internacional según el Tratado de Budapest el 7 de septiembre de 2011.

El hibridoma PPAT-055-15 que produce el anticuerpo PPAT-055-15 se depositó internacionalmente en el National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (2-5-8, Kazusakamatori, Kisarazushi, Chiba, 292-0818, Japón) con el número de registro: NITE BP-1145 según el Tratado de Budapest.

Ejemplo 7: Clasificación de anticuerpo monoclonal anti-CDH3 basándose en el epítipo

Se llevó a cabo la clasificación basada en epítipos del anticuerpo anti-CDH3 humano obtenido basándose en la reacción del mismo con un fragmento que expresa una secuencia parcial de CDH3 humano analizada mediante

inmunotransferencia de tipo Western. Con el fin de que las secuencias se solapen suficientemente entre sí entre los fragmentos, se diseñaron los fragmentos 1 a 5 que expresan una secuencia parcial de CDH3 humano (figura 8).

(1) Producción de vector de expresión para un fragmento que expresa una secuencia parcial de CDH3 humano

Se realizó PCR con el uso del ADNc de CDH3 humano de longitud completa del ejemplo 3 como molde y los conjuntos de cebadores descritos a continuación. Se llevó a cabo la reacción con el uso de ADN polimerasa iProof high-fidelity (Bio-Rad Laboratories, Inc.) repitiendo un ciclo de 98 °C durante 10 segundos, 60 °C durante 10 segundos y 72 °C durante 30 segundos 35 veces. Se escindió un fragmento de gel que contenía una banda con un tamaño similar al tamaño objetivo por medio de electroforesis en gel de agarosa, y se obtuvo una secuencia parcial de ADNc de CDH3 humano de interés usando un kit de extracción de gel QIA® quick.

Con el fin de insertar la secuencia parcial de CDH3 humano en un vector de expresión de *E. coli* (pCold® TF, Takara Bio Inc.), se trató la secuencia parcial con dos enzimas de restricción KpII y XbaI. Entonces se insertó el fragmento así obtenido en pCold TF, que se había tratado con las mismas enzimas de restricción KpI y XbaI, con el uso de ADN ligasa de T4 según una técnica convencional, y se obtuvieron vectores de expresión para los fragmentos. Se llevó a cabo PCR usando los conjuntos de cebadores descritos a continuación de modo que se obtuvo cada fragmento.

Fragmento 1 (posiciones 108 a 236 de SEQ ID NO: 2)

Cebador directo: TATGGAGCTCGGTACCGATTGGGTGGTTGCTCCAATATCTG (SEQ ID NO: 9)

Cebador inverso: AGATTACCTATCTAGACTACTGCATCACAGAAGTACCTGGTAGG (SEQ ID NO: 10)

Fragmento 2 (posiciones 132 a 348 de SEQ ID NO: 2)

Cebador directo: TATGGAGCTCGGTACCAAGTCTAATAAAGATAGAGACACCAAG (SEQ ID NO: 11)

Cebador inverso: AGATTACCTATCTAGACTACCTCTGCACCTCATGGCCCACTGCATTCTCA (SEQ ID NO: 12)

Fragmento 3 (posiciones 237 a 461 de SEQ ID NO: 2)

Cebador directo: TATGGAGCTCGGTACCGTGACAGCCACGGATGAGGATGATG (SEQ ID NO: 13)

Cebador inverso: AGATTACCTATCTAGACTAGACACACAGGCTCCCCAGTG (SEQ ID NO: 14)

Fragmento 4 (posiciones 349 a 550 de SEQ ID NO: 2)

Cebador directo: TATGGAGCTCGGTACCCTGACGGTCACTGATCTGGACG (SEQ ID NO: 15)

Cebador inverso: AGATTACCTATCTAGACTAGGGCTCAGGGACTGGGCCATGGTCATTG (SEQ ID NO: 16)

Fragmento 5 (posiciones 462 a 654 de SEQ ID NO: 2)

Cebador directo: TATGGAGCTCGGTACCTACACTGCAGAAGACCTGACAAGG (SEQ ID NO: 17)

Cebador inverso: AGATTACCTATCTAGACTAACCTCCCTTCCAGGGTCCAGGGCAGGTTTCG (SEQ ID NO: 18)

(2) Expresión de la secuencia parcial de CDH3 humano

Con el uso del vector de expresión para el fragmento CDH3 de (1), se transformaron células de *E. coli* Rossetta® 2 (Merck) según una técnica convencional, y se cultivaron las células transformadas en un medio LB. Cuando la absorbancia a 600 nm alcanzó 0,4, se enfrió con hielo el producto de cultivo durante 30 minutos, se ajustó la concentración de isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a 0,5 mM y se realizó el cultivo a 20 °C durante 18 horas, seguido por la recuperación del producto de cultivo.

Se inspeccionó la expresión de la secuencia parcial de CDH3 humano mediante electroforesis de la disolución de cultivo de *E. coli*, seguido por análisis de inmunotransferencia de tipo Western usando el anticuerpo anti-Penta-His (Qiagen) para detectar la presencia de una banda en una posición deducida.

Específicamente, se añadió un tampón de electroforesis en una cantidad igual a un décimo de la cantidad de la disolución de cultivo de *E. coli*, se cargó la mezcla y se sometió a electroforesis sobre gel en gradiente del 5 % al 20 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en condiciones reductoras, y se transfirió el resultante a Immobilon® P (Millipore Corporation). Se lavó la membrana de transferencia suavemente con TBS-T (Tween® 20 al 0,05 %, TBS) y luego se sometió a agitación en TBS que contenía BSA al 40 % durante 1 hora. Después de eso, se añadieron a lo mismo anticuerpos anti-CDH3 diluidos con TBS-T que contenía Block Ace® al 10 % (Snow Brand Milk Products, Co. Ltd.), y

se sometió la membrana a agitación durante 1 hora. Se lavó la membrana con TBS-T, se sometió a agitación con el anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (GE Healthcare Biosciences Inc.) diluido con TBS-T que contenía Block Ace al 10 % durante 1 hora, y luego se lavó con TBS-T. Se detectó el desarrollo de color usando ECL®-Plus (GE Healthcare Biosciences Inc.) y una película de rayos X (RX-u, Fuji Film Corporation) según las instrucciones facilitadas por los fabricantes. La figura 9 muestra los resultados de detección.

(3) Clasificación de anticuerpo basándose en el epítipo usando el producto de expresión de la secuencia de CDH3 parcial

Se cargaron lisados de *E. coli* en los que se habían expresado las secuencias de CDH3 parciales mencionadas anteriormente y se sometieron a electroforesis sobre gel en gradiente del 5 % al 20 % (Bio-Rad Laboratories, Inc.) en condiciones reductoras, y se transfirieron los resultantes a Immobilon P (Millipore Corporation) usando un aparato de inmunotransferencia (Bio-Rad Laboratories, Inc.). Se lavó la membrana de transferencia suavemente con TBS-T (Tween® 20 al 0,05 %, TBS) y luego se sometió a agitación en TBS que contenía BSA al 40 % durante 1 hora. Después de eso, se cortó la membrana en tiras de igual anchura, se añadieron a lo mismo anticuerpos anti-CDH3 diluidos con TBS-T que contenía Block Ace al 10 % y se sometió la membrana a agitación durante 1 hora. Se lavó la membrana con TBS-T, se sometió a agitación con el anticuerpo anti-IgG de ratón-HRP (GE Healthcare Biosciences Inc.) diluido con TBS-T que contenía Block Ace al 10 % durante 1 hora, y luego se lavó con TBS-T. Se detectó el desarrollo de color usando ECL®-Plus (GE Healthcare Biosciences Inc.) y una película de rayos X (RX-u, Fuji Film Corporation) según las instrucciones facilitadas por los fabricantes. La figura 10 muestra los resultados de detección. Basándose en la reactividad con el producto de expresión de secuencias parciales de CDH3, se determinaron los dominios reconocidos por los anticuerpos.

(4) Determinación del epítipo del anticuerpo monoclonal anti-CDH3 usando un alineamiento de péptidos

Cuando se determina un epítipo usando el producto de expresión de las secuencias de CDH3 parciales descritas en (3) anteriormente, se aplicó el anticuerpo PPAT-055-13 que se consideró que correspondía al límite de epítipo a un alineamiento de péptidos (Replitope; fabricado por JPT Peptide Technologies) y se sometió a determinación de epítipos en mayor detalle. Específicamente, con respecto a una región correspondiente a la región extracelular de CDH3 (que corresponde a las posiciones 108-563 de SEQ ID NO: 2), se diseñó un péptido de 13 residuos y se sintetizó, mientras que cada residuo inicial estaba desplazado por cada dos residuos de aminoácido desde el extremo N-terminal (es decir, las posiciones 108-120, 110-122, ... y 551-563). Los péptidos así sintetizados se inmovilizaron sobre un portaobjetos de vidrio, y luego se bloquearon mediante SuperBlock (Thermo Fisher Scientific Inc.). Se hizo reaccionar el producto así preparado con un anticuerpo que es una diana de búsqueda de epítipos como anticuerpo primario. Se lavó el producto de reacción tres veces con TBS-T, y entonces se llevó a cabo la detección usando un anticuerpo de anti-ratón (Thermo Fisher Scientific Inc.) que se había marcado fluorescentemente con Dylight 649. Se usó un anticuerpo que no se había permitido que reaccionara con el anticuerpo que es una diana de búsqueda de epítipos como control negativo en los ensayos. Los resultados de los ensayos se muestran en la figura 11. Se observaron señales fuertes en regiones correspondientes a las posiciones 446-472 y 490-504 de la secuencia de aminoácidos de CDH3 mostrada en SEQ ID NO: 2, y se supuso que estos eran epítipos del presente anticuerpo.

La correlación referente a las regiones en la secuencia de CDH3 reconocidas por los anticuerpos deducidas basándose en el experimento anterior se muestra en la tabla 2 junto con los resultados de la prueba de internalización mostrada en la tabla 1.

[Tabla 2]

N.º de anticuerpo	Subtipo	Viabilidad celular (%, prueba A)	Viabilidad celular (%, prueba B)	Dominio de reconocimiento
PPAT-055-01	IgG1	92	85	EC3
PPAT-055-02	IgG2a	31	42	EC1
PPAT-055-03	IgG1	34	50	EC1
PPAT-055-05	IgG1		69	EC1
PPAT-055-07	IgG2a		45	EC1
PPAT-055-08	IgG2a	43	40	EC1
PPAT-055-09	IgG1	26	57	EC1
PPAT-055-10	IgG1		61	EC1
PPAT-055-11	IgG1		59	EC1
PPAT-055-12	IgG2a	47	58	EC1
PPAT-055-13	IgG1	99	95	EC3
PPAT-055-14	IgG1		87	EC4
PPAT-055-15	IgG1	23		EC1
PPAT-055-16	IgG1	88	89	EC5
PPAT-055-17	IgG1	93	87	EC5
PPAT-055-18	IgG1	65	EC4	
PPAT-055-19	IgG2b	85	79	EC4

PPAT-055-20	IgG2a	78	EC2
PPAT-055-21	IgG2a	57	EC1
PPAT-055-24	IgG2a	44	EC1
PPAT-055-25	IgG1	54	EC1

* Se dedujo que PPAT-055-13 reconocía el límite entre EC3 y EC4.

La relación entre los dominios de reconocimiento en la tabla y la posición de aminoácido mostrada en SEQ ID NO: 2 son las siguientes.

EC1: posiciones 108 a 236

EC2: posiciones 237 a 348

EC3: posiciones 349 a 461

EC4: posiciones 462 a 550

EC5: posiciones 551 a 654

Basándose en los resultados de determinación de los dominios que van a reconocer los anticuerpos, se examinó la relación entre el dominio de reconocimiento y la capacidad de internalización. Como resultado, se encontró que los anticuerpos que tenían una alta capacidad de internalización se concentraban en el dominio EC1 de CDH3 humano.

Ejemplo 8: Purificación de ARN a partir de hibridomas

Se aislaron ARN citoplasmáticos a partir del hibridoma PPAT-055-09 (número de registro NITE BP-989) y el hibridoma PPAT-055-24 (número de registro NITE BP-991) según el método descrito por Gough (Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells, Analytical Biochemistry, 173, págs. 93-95, 1988), aunque se usó un tampón TNE diferente (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NP-40 al 1 %, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) en lugar de un tampón de lisis descrito en el mismo. Específicamente, se suspendieron 5×10^6 células de hibridoma en 0,2 ml de tampón TNE para lisar la membrana citoplasmática, y entonces se eliminaron los núcleos celulares por medio de centrifugación. Se añadió un tampón de extracción (0,2 ml, Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 0,35 M, SDS al 1 % (p/v), EDTA 10 mM, pH 8,0, urea 7 M) a aproximadamente 0,2 ml del sobrenadante citoplasmático resultante. Se sometió la mezcla a extracción con fenol y cloroformo, y se añadió un portador de glucógeno (n.º de cat. 901393, Roche Diagnostics K.K.) a la disolución de ARN resultante, seguido por precipitación con etanol. Posteriormente, se lisó el precipitado de ARN con la adición de 10 a 50 μ l de agua destilada estéril a una concentración de ARN citoplasmática de 0,5 a 2 μ g/ μ l.

Ejemplo 9: Producción de una biblioteca de ADNc a partir de ARN preparado a partir de hibridoma

Con el fin de sintetizar un ADNc de cadena sencilla, se prepararon 20 μ l de una mezcla de reacción que contenía de 0,5 a 3 μ g del ARN citoplasmático preparado anteriormente, Tris-HCl 50 mM (pH 8,3, temperatura ambiente), KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM, 100 ng de un cebador al azar, dNTP 0,5 mM y 200 unidades de Superscript II (transcriptasa inversa, Invitrogen), y se incubó la mezcla a 42 °C durante 50 minutos. Se empleó directamente la biblioteca de ADNc así sintetizada como molde de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Ejemplo 10: Amplificación del gen que codifica para la región variable de anticuerpo anti-CDH3 humano mediante PCR

Todos los cebadores empleados en los experimentos los sintetizó Hokkaido System Science Co., Ltd.

A. Cebadores para su uso en amplificación por PCR del gen que codifica para región variable de cadena ligera de ratón

Se emplearon los siguientes dos conjuntos de cebadores: (1) un cebador de ADN que tiene, en el extremo 5', una homología con la parte FR1 y cebadores del conjunto 4 que tenían, en el extremo 3', una homología con una gen de cadena J en la cadena L de ratón, y (2) cebadores del conjunto 7 que tienen, en el extremo 5', una homología con la parte de señal de cadena L y un cebador antisentido que tiene, en el extremo 3', una homología con la parte KC (cebador antisentido KVL). Se realizó reacción en cadena de la polimerasa con el uso de los dos conjuntos de cebadores, mediante lo cual se aisló ADN de región variable de cadena L de inmunoglobulina de ratón a partir del ADNc. Las secuencias de cebadores eran tal como sigue.

(1) Cebadores sentido del conjunto 4 para la clonación de la región variable de cadena L de ratón

Según "Phage Display-A Laboratory Manual", Barbas Burton Scott Silverman", PROTOCOLO 9.5, Hokkaido System

Science Co., Ltd. sintetizó 17 tipos de cebadores sentido y 3 tipos de cebadores inversos.

VK sentido (parte FR1)

5 Se empleó una mezcla de los siguientes 17 cebadores como cebador VK sentido (parte FR1). En secuencias de nucleótidos, W indica A o T, R indica A o G, M indica A o C, K indica T o G, Y indica T o C, S indica G o C, H indica A, C o T, B indica G, C o T, V indica A, G o C, D indica A, G o T, y N indica A, G, C o T.

10 SEQ ID NO: 19: 5'-GAYATCCAGCTGACTCAGCC-3' (degeneración: 2)

SEQ ID NO: 20: 5'-GAYATTGTTCTCWCCCAGTC-3' (degeneración: 4)

SEQ ID NO: 21: 5'-GAYATTGTGMTMACTCAGTC-3' (degeneración: 8)

15 SEQ ID NO: 22: 5'-GAYATTGTGYTRACACAGTC-3' (degeneración: 8)

SEQ ID NO: 23: 5'-GAYATTGTRATGACMCAGTC-3' (degeneración: 8)

20 SEQ ID NO: 24: 5'-GAYATTMAGATRAMCCAGTC-3' (degeneración: 16)

SEQ ID NO: 25: 5'-GAYATTCAGATGAYDCAGTC-3' (degeneración: 12)

SEQ ID NO: 26: 5'-GAYATYCAGATGACACAGAC-3' (degeneración: 4)

25 SEQ ID NO: 27: 5'-GAYATTGTTCTCAWCCAGTC-3' (degeneración: 4)

SEQ ID NO: 28: 5'-GAYATTGWGCTSACCCAATC-3' (degeneración: 8)

30 SEQ ID NO: 29: 5'-GAYATTSTRATGACCCARTC-3' (degeneración: 16)

SEQ ID NO: 30: 5'-GAYRTTKTGATGACCCARAC-3' (degeneración: 16)

SEQ ID NO: 31: 5'-GAYATTGTGATGACBCAGKC-3' (degeneración: 12)

35 SEQ ID NO: 32: 5'-GAYATTGTGATAACYCAGGA-3' (degeneración: 4)

SEQ ID NO: 33: 5'-GAYATTGTGATGACCCAGWT-3' (degeneración: 4)

SEQ ID NO: 34: 5'-GAYATTGTGATGACACAACC-3' (degeneración: 2)

40 SEQ ID NO: 35: 5'-GAYATTTTGCTGACTCAGTC-3' (degeneración: 2)

J antisentido (cebadores del conjunto 4)

45 Cebador J1/J2 antisentido (1)

SEQ ID NO: 36: 5'-GGSACCAARCTGGAAATMAAA-3' (degeneración: 8)

Cebador J4 antisentido (2)

50 SEQ ID NO: 37: 5'-GGGACAAAGTTGGAAATAAAA-3'

Cebador J5 antisentido (3)

55 SEQ ID NO: 38: 5'-GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA-3'

Mezcla de cebadores J1/J2, J4, J5 antisentido (4)

(2) Cebadores del conjunto 7 para la clonación de la región variable de cadena L de ratón

60 VK sentido (parte de péptido señal)

Se obtuvieron los cebadores mediante modificación de la secuencia de nucleótidos de un conjunto de cebadores de Ig de ratón (Novagen; Merck, n.º de cat. 69831-3) y se eliminaron por tanto de los mismos los sitios de enzimas de restricción.

Cebador sentido del conjunto A

SEQ ID NO: 39: 5'-ATGRAGWCACAKWCYCAGGTCTTT-3'

5 Cebador sentido del conjunto B

SEQ ID NO: 40: 5'-ATGGAGACAGACACACTCCTGCTAT-3'

Cebador sentido del conjunto C

10 SEQ ID NO: 41: 5'-ATGGAGWCAGACACACTSCTGYTATGGGT-3'

Cebador sentido del conjunto D (una mezcla de los siguientes 2 cebadores)

15 SEQ ID NO: 42: 5'-ATGAGGRCCCCTGCTCAGWTTYTTGGIWTCTT-3'

SEQ ID NO: 43: 5'-ATGGGCWTCAGATGRAGTCACAKWYYCWGG-3'

Cebador sentido del conjunto E (una mezcla de los siguientes 3 cebadores)

20 SEQ ID NO: 44: 5'-ATGAGTGTGCYCACTCAGGTCCTGGSGTT-3'

SEQ ID NO: 45: 5'-ATGTGGGGAYCGKTTYAMMCTTTTCAATTG-3'

25 SEQ ID NO: 46: 5'-ATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTTCC-3'

Cebador sentido del conjunto F (una mezcla de los siguientes 4 cebadores)

30 SEQ ID NO: 47: 5'-ATGAGIMMKTCIMTTCAITTCYTGGG-3'

SEQ ID NO: 48: 5'-ATGAKGTHCYCIGCTCAGYTYCTIRG-3'

SEQ ID NO: 49: 5'-ATGGTRTCCWCASCTCAGTTCCTTG-3'

35 SEQ ID NO: 50: 5'-ATGTATATATGTTTGTGTCTATTCT-3'

Cebador sentido del conjunto G (una mezcla de los siguientes 4 cebadores)

40 SEQ ID NO: 51: 5'-ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCT-3'

SEQ ID NO: 52: 5'-ATGGATTTWCARGTGCAGATTWTCAGCTT-3'

SEQ ID NO: 53: 5'-ATGGTYCTYATVTCCTTGCTGTTCTGG-3'

45 SEQ ID NO: 54: 5'-ATGGTYCTYATVTTRCTGCTGCTATGG-3'

Cebador antisentido K VL

50 SEQ ID NO: 55: 5'-ACTGGATGGTGGGAAGATGGA-3'

B. Cebadores para su uso en la amplificación por PCR del gen que codifica para la región V de cadena H de ratón

Se emplearon los siguientes dos conjuntos de cebadores: cebadores del conjunto 4 que tenían, en el extremo 5', una homología con la parte de señal de cadena H de ratón y un cebador que tenía, en el extremo 3', una homología con la parte de KC; y 1 conjunto de cebadores que tenían cada uno, en el extremo 5', una homología con la parte FR1 y un cebador de 2 tipos que tenía, en el extremo 3', una homología con la región constante de cadena H de ratón (IGHC). Se realizó reacción en cadena de la polimerasa con el uso de los dos conjuntos de cebadores, mediante lo cual se aisló ADN de la región variable de cadena H de inmunoglobulina de ratón a partir del ADNc. Las secuencias de cebador eran tal como sigue.

60 (3) Cebadores para clonar la región variable de cadena H de ratón

VH sentido (parte de señal: cebadores del conjunto 4)

65 Estos cebadores se sintetizaron según Current Protocols in Immunology (John Wiley and Sons, Inc.), unidad 2.12 Clonación, expresión y modificación de regiones de anticuerpo V (tabla 2.12.2).

SEQ ID NO: 56: 5'-ATGGRATGSAGCTGKGTMATSCTCTT-3' (degeneración: 32)

SEQ ID NO: 57: 5'-ATGRACCTCGGGYTGAGCTKGGTTTT-3' (degeneración: 8)

SEQ ID NO: 58: 5'-ATGGCTGTCTTGGGGCTGCTCTTCT-3'

SEQ ID NO: 59: 5'-ATGGRCAGRCTTACWTYY-3' (degeneración: 32)

(4) Cebadores para la clonación de la región variable de cadena H de ratón

VH sentido (parte de FR1)

Se diseñaron estos cebadores mediante modificación de la secuencia de nucleótidos de cebadores sentido divulgados en un documento (Tan *et al*, "Superhumanized" Antibodies: Reduction of Immunogenic Potential by Complementarity-Determining Region Grafting with Human Germline Sequences: Application to an Anti-CD281, Journal of Immunology 169, 2002, págs. 1119-1125).

SEQ ID NO: 60: 5'-SAGGTSMARCKSAGSAGTCWGG-3' (degeneración: 256)

VH antisentido (cebador antisentido común a 3 y 4)

Se diseñó el cebador a través de degeneración de la secuencia de nucleótidos, de modo que el cebador se aparearía con todas las isoformas de IgG de ratón.

SEQ ID NO: 61: 5'-CASCCCATCDGTCTATCC-3' (degeneración: 6)

Ejemplo 11: Producción de vector de expresión transitorio para inmunoglobulina anti-CDH3 humano quimera

Producción de plásmido de expresión:

A través de PCR usando el instrumento DNA Engine (ciclador térmico Peltier, Bio-Rad Laboratories, Inc.), se amplificó cada región variable de la cadena L y la cadena H de un anticuerpo monoclonal de ratón anti-CDH3 con el uso de los cebadores descritos en el ejemplo 10. Se incorporó cada uno de los fragmentos de ADN así amplificados en un vector de subclonación pGEM (Promega). Se determinó la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN con el uso de cebadores universales T7 y SP6 del vector.

Se realizaron búsquedas de las secuencias de nucleótidos de regiones variables de cadena L y cadena H del anticuerpo anti-CDH3 humano quimera así obtenido en la página IMGT/V-QUEST Search (http://www.imgt.org/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=mouselg), mediante lo cual se confirmó la finalización de la clonación de los genes de anticuerpo.

Posteriormente, se diseñó un gen que codificaba para la región C κ humana para que se uniera a un vector de expresión de cadena L quimérico, y se diseñó un gen que codificaba para la región C γ humana para que se uniera a un vector de expresión de cadena H quimérica para construir genes que codifican para las regiones V de la cadena L y la cadena H del anticuerpo anti-CDH3 clonado. Los genes de anticuerpo quimérico de cadena L y cadena H así diseñados los sintetizó en longitud completa GenScript Inc. En ese momento, se optimizó la frecuencia de uso de codones para que lograr una expresión génica eficaz en células productoras CHO (según un método divulgado en Kim *et al.*, Codon optimization for high-level expression of human erythropoietin (EPO) in mammalian cells, Gene, 199, 1997, págs. 293-301). En el caso de la cadena L, específicamente, una secuencia de ADN esencial para la traducción eficaz (Kozak, M., J., At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells, J. Mol. Biol. 196, págs. 947-950, 1987), un péptido señal de IGKV de ratón (una región variable de cadena κ), la región V de la cadena L del anticuerpo anti-CDH3 y la región KC humana (es decir, una región constante de cadena κ) se yuxtapusieron en este orden, y se añadieron sitios de enzimas de restricción en ambos extremos (NheI en el lado 5' y EcoRI en el lado 3'). Se preparó la cadena H quimera de la misma manera. Se escindió cada uno de los genes sintetizados artificialmente con NheI y EcoRI, y se incorporó el fragmento escindido en un vector de expresión pCAGGS entre el sitio NheI y el sitio EcoRI, para producir de ese modo un vector de expresión de cadena L de anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano pCAGGSIGK y un vector de expresión de cadena H pCAGGS-IGH.

Ejemplo 12: Producción de vector de expresión estable para anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano

Con el fin de realizar la expresión a alto nivel de un gen de anticuerpo modificado por ingeniería genética en células CHO, se produjo un vector de expresión en el que se insertó un gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) unido a una secuencia de promotor de CMV y que tenía una señal de poli A.

Con el fin de producir una línea celular que produce/expresa de manera estable anticuerpos quiméricos, se produjo

un vector de expresión pCAGGS en el que se insertó un gen de dhfr. Específicamente, se insertó un gen de dhfr que tenía un promotor de CMV y una señal de poli A en pCAGGS-IGH y pCAGGS-IGK, que son vectores de expresión transitorios. Se amplificaron un promotor de CMV, un gen de dhfr de ratón que tenía la secuencia Kozak y señal de poli A de SV40 por medio de PCR. Se unieron entre sí estos genes en forma de mezcla por medio de PCR, y se añadió un sitio HindIII en ambos extremos del producto unido, para obtener de ese modo un fragmento génico de HindIII-promotor de CMV-Kozak-dhfr-poli A-HindIII. Se insertó este fragmento en el sitio HindIII de pCAGGS-IGH o pCAGGS-IGK, para obtener de ese modo pCAGGS-IGH-CMVp-dhfr-A y pCAGGS-IGK-CMVp-dhfr-A. Estos vectores de expresión permiten la expresión de anticuerpo quimérico con un promotor de CAG, y la expresión de un gen de dhfr con un promotor de CMV, mediante lo cual puede producirse eficazmente un anticuerpo quimérico a través de amplificación génica.

Ejemplo 13: Establecimiento de una línea celular CHO que produce anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano

Se transformaron simultáneamente células CHO dhfr(-) (G. Urlaub *et al.*, Isolation of Chinese hamster cell mutants deficient in dihydrofolate reductase activity, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 77, págs. 4216-4220, 1980) con el uso de dos plásmidos (plásmidos lineales obtenidos escindiendo plásmidos circulares con PvuI en un gen resistente a ampicilina); es decir, un vector pCAGGS-IGK-CMV-dhfr-A para la expresión de cadena L anti-CDH3 quimera y un vector pCAGGS-IGH-CMV-dhfr-A para la expresión de cadena H anti-CDH3 quimera. Se realizó la electroporación por medio de Amaxa (Lonza). Se añadió un ADN (0,002 mg/muestra; en el caso de plásmido de cadena L o plásmido de cadena H) a 0,1 ml de tampón de CHO de electroporación Amaxa que contenía 3×10^3 células, y se aplicó un pulso.

Se añadieron las células que se habían sometido a electroporación a un medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM) libre de HT (H: hipoxantina; T: timidina) que contenía FBS dializado al 10 %. Tres días tras la transfección, se intercambió el medio por un medio IMDM libre de FBS dializado al 10 %, L-glutamina 2 mM y HT, y se seleccionaron células transformadas neo+ con el uso de G418 1 mg/ml, para obtener de ese modo clones de una línea celular positiva que produce anticuerpo quimérico. Posteriormente, se realizó amplificación génica con el uso de los clones seleccionados con el uso de G418. Se realizó una amplificación de dos rondas en metotrexato 0,25 mM (MTX) y 1 mM (MTX), y se establecieron líneas celulares que pueden producir un anticuerpo anti-CDH3 humano quimera (de aproximadamente 50 a 100 mg/l).

Ejemplo 14: Cuantificación de anticuerpo quimérico por medio de inmunoensayo enzimático (ELISA)

Se analizó el sobrenadante de cultivo de las células CHO transfectadas por medio de ELISA para confirmar la producción del anticuerpo quimérico. Con el fin de detectar un anticuerpo quimérico, se recubrió una placa con anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) (preabsorbido con IgG de ratón, conejo, bovina y de ratón) (AQL, cat. A-110UD; COSMO BIO Co., Ltd.). Tras bloquear, se sometió el sobrenadante de cultivo obtenido de las células CHO que producen anticuerpo quimérico anti-CDH3 a dilución en serie, y se añadió a los pocillos. Tras someterse la placa a incubación y lavado, se añadió anticuerpo de cabra anti-IgG humana (H+L) (preabsorbido con IgG de ratón, conejo, bovina y de ratón)-HRP (AQL, cat. A-110 PD; COSMO BIO Co., Ltd.). Tras la incubación y el lavado, se añadió un tampón de sustrato. Se llevó a cabo adicionalmente incubación, se terminó la reacción y entonces se sometió a ensayo la absorbancia a 450 nm. Se usó IgG humana purificada como patrón.

Ejemplo 15: Evaluación de la capacidad de internalización de anticuerpo quimérico

Se sometió a ensayo la capacidad de internalización del anticuerpo quimérico preparado de la misma manera que en el ejemplo 6, excepto porque se usó HumZAP (Advanced Targeting Systems, Inc.) como anticuerpo marcado con saporina con el fin de tratar con un anticuerpo quimérico. Como resultado, se encontró que el anticuerpo quimérico mantenía la capacidad de internalización observada en el anticuerpo parental. La tabla 3 muestra los resultados de la prueba de internalización del anticuerpo quimérico en combinación con los resultados del anticuerpo parental mostrados en la tabla 1.

[Tabla 3]

N.º de anticuerpo parental	Subtipo	Viabilidad celular de anticuerpo parental (% prueba A)	Viabilidad celular de anticuerpo parental (% prueba B)	Dominio de reconocimiento	N.º de anticuerpo quimérico	Viabilidad celular de anticuerpo quimérico (%)
PPAT-055-15	IgG1	23		EC1		
PPAT-055-08	IgG2a	43	40	EC1		
PPAT-055-02	IgG2a	31	42	EC1		
PPAT-055-24	IgG2a		44	EC1	PPAT-055-24C	41
PPAT-055-07	IgG2a		45	EC1		
PPAT-055-03	IgG1	34	50	EC1		
PPAT-055-25	IgG1		54	EC1		
PPAT-055-09	IgG1	26	57	EC1	PPAT-055-09C	44

PPAT-055-21	IgG2a		57	EC1		
PPAT-055-12	IgG2a	47	58	EC1		
PPAT-055-11	IgG1		59	EC1		
PPAT-055-10	IgG1		61	EC1		
PPAT-055-18	IgG1		65	EC4		
PPAT-055-05	IgG1		69	EC1		
PPAT-055-20	IgG2a		78	EC2		
PPAT-055-19	IgG2b	85	79	EC4		
PPAT-055-01	IgG1	92	85	EC3		
PPAT-055-14	IgG1		87	EC4		
PPAT-055-17	IgG1	93	87	EC5	PPAT-055-17C	91
PPAT-055-16	IgG1	88	89	EC5		
PPAT-055-13	IgG1	99	95	EC3		
Negativo Ab1	IgG2a		97			
Negativo Ab2	IgG1	90	98			

* Se dedujo que PPAT-055-13 reconocía el límite entre EC3 y EC4.

Las líneas celulares PPAT-055-9C y PPAT-055-24C que producen los anticuerpos quiméricos PPAT-055-9C y PPAT-055-24C se depositaron internacionalmente en el National Institute of Technology and Evaluation, Patent Microorganisms Depositary (2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazushi, Chiba, 292-0818, Japón) con los números de registro: NITE BP-1147 y NITE BP-1148, respectivamente, el 27 de septiembre de 2011 según el Tratado de Budapest.

Ejemplo 16: Síntesis de fármacos

Se preparó DM1SMe de la manera descrita en las patentes estadounidense números 5.208.020 y 6.333.410B1 (figura 12).

Ejemplo 17: Preparación de anticuerpo conjugado con fármaco

(1) Tratamiento de reducción del fármaco que va a conjugarse

Se mezclaron una disolución de 0,78 mg de DM1SMe disuelto en 300 μ l de etanol, 180 μ l de tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7,5) y 20 μ l de disolución TCEP (Bond Breaker, Thermo Fisher Scientific Inc.), y se sometió la mezcla resultante a la reacción bajo la atmósfera de nitrógeno a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos con agitación para reducir los fármacos.

Se purificaron los fármacos reducidos por medio de HPLC, se retiró el disolvente de los mismos mediante destilación y se disolvió el resultante en dimetilacetamida hasta una concentración de fármaco de 10 mg/ml.

(2) Preparación de anticuerpo conjugado con maleimida

Se añadió un exceso molar de 30 veces de sulfo-SMCC (Thermo Fisher Scientific Inc.) a anticuerpo quimérico anti-CDH3 humano 1 mg/ml, y se permitió que la reacción avanzara a 30 °C durante 1 hora.

Con el fin de eliminar los agentes de reticulación en exceso, se sometió el producto de reacción a desalación con el uso de las columnas de desalación Zeba Spin (Thermo Fisher Scientific Inc.) equilibradas con fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM (pH 6,5).

(3) Modificación de anticuerpo con fármaco

Se sometieron el anticuerpo quimérico anti-CDH3 conjugado con maleimida (1 mg/ml) y un fármaco reducido en una cantidad igual a 1,7 veces mayor que la del número de grupos maleimida conjugados a la reacción en fosfato de potasio 50 mM, NaCl 50 mM y EDTA 2 mM (pH 6,5) a temperatura ambiente durante la noche. Se llevó a cabo filtración en gel por medio de HPLC con el fin de retirar los fármacos en exceso.

Ejemplo 18: Cuantificación de la conjugación de anticuerpo-fármaco

Se determinó el número de fármacos conjugados con un anticuerpo sometiendo a ensayo la absorbancia a 252 nm y 280 nm con el uso de las constantes de absorción: $\epsilon_{Ab280} = 223\,000\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{Ab252} = 82\,510\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, $\epsilon_{DM1280} = 5180\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ y $\epsilon_{DM1252} = 26\,160\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$, descritos en un documento no de patente (Widdison, W. C., Wilhelm, S. D., Cavanagh, E. E., *et al.*, 2006, Semisynthetic maytansine analogues for the targeted treatment of cancer, J. Med. Chem., 49, 4392-4408). Como resultado, se dedujo que se introdujeron aproximadamente 3 o 4 fármacos por molécula de anticuerpo. Los resultados de los ensayos se muestran en la tabla 4.

[Tabla 4]

N.º de anticuerpo quimérico	A280	A252	Número de fármacos conjugados con una molécula de anticuerpo
PPAT-055-09C	1,36	1,00	3,63
PPAT-055-24C	1,31	0,91	3,20

Ejemplo 19: Prueba *in vitro*

5 Se evaluaron la citotoxicidad y especificidad de anticuerpos conjugados con fármacos usando un reactivo de recuento de proliferación celular con el uso de un sustrato colorante WST-8 (Cell Counting Kit-8, DOJINDO LABORATORIES, Inc.).

10 Específicamente, se incubaron juntas cantidades arbitrarias de las células de cáncer de mama humanas HCC1954 (ATCC CRL-2338), que se había confirmado que presentaban expresión de CDH3 humano de alto nivel, y un conjugado de anticuerpo-fármaco (ADC) o un anticuerpo no conjugado (Desnudo) a 37 °C en presencia del 5 % de CO₂ durante 3 días. Después de eso, se añadió un reactivo de proliferación celular, se permitió que el producto reposara, y se sometió a ensayo la absorbancia a A450/A620. La absorbancia sometida a ensayo en el pocillo en el

15 que se habían añadido células cancerosas pero no se habían añadido anticuerpos se designó como el 100 %, y se expresó el valor en relación con el mismo como viabilidad celular (figura 13).

Ejemplo 20: Prueba *in vivo*

20 Se examinaron los efectos citorreductores de conjugados de anticuerpo-fármaco *in vivo* usando modelos de xenoinjerto a los que se les había trasplantado células de cáncer de mama humanas HCC1954. Se disolvieron anticuerpos anti-asialo GM1 (WAKO 014-09801) en 1 ml de agua destilada de Otsuka, se añadieron a lo mismo 4 ml de solución salina isotónica de Otsuka para llevar la cantidad total de la disolución hasta 5 ml, y se administró por vía intraperitoneal la disolución resultante en una cantidad de 100 µl por ratón. Se cultivaron las células HCC1954 en

25 medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 %, y se trasplantó por vía hipodérmica el resultante a ratones SCID (hembra, CLEA Japan, Inc.) en la región abdominal lateral derecha hasta una densidad celular de 5 × 10⁶ células/ratón.

Antes de la prueba, se examinó la expresión de CDH3 en la masa tumoral de HCC1954 trasplantada por medio de tinción inmunohistoquímica (IHC) de la misma manera que en el ejemplo 5. Los resultados se muestran en la figura

30 14.

Se llevó a cabo la prueba *in vivo* usando los grupos que consisten cada uno en 5 ratones, y se administró el fármaco en una cantidad de 15 mg/kg a través de la vena caudal. Se inició la administración cuando el tamaño tumoral promedio alcanzó de 100 a 150 mm³, y se administró la misma cantidad de los fármacos 1 semana después. Es decir, se llevó

35 a cabo la administración de fármacos dos veces en total.

Los cambios en los tamaños tumorales se muestran en la figura 15.

Lista de secuencias

40 <110> Perseus Proteomics Inc.
<120> Anticuerpo anti-CDH3 que tiene alta capacidad de internalización
<130> 111277A
<140> Documento EP 11836461.1
45 <141> 28-10-2011
<150> Documento JP 2010-243708
<151> 29-10-2010
<150> Documento JP 2011-150812
<151> 07-07-2011
50 <160> 61
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 2490
<212> ADN
55 <213> *Homo sapiens*
<220>
<221> CDS
<222> (1)..(2490)
<400> 1

ES 2 931 477 T3

atg ggg ctc cct cgt gga cct ctc gcg tct ctc ctc ctt ctc cag gtt	48
Met Gly Leu Pro Arg Gly Pro Leu Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Val	
1 5 10 15	
tgc tgg ctg cag tgc gcg gcc tcc gag ccg tgc cgg gcg gtc ttc agg	96
Cys Trp Leu Gln Cys Ala Ala Ser Glu Pro Cys Arg Ala Val Phe Arg	
20 25 30	
gag gct gaa gtg acc ttg gag gcg gga ggc gcg gag cag gag ccc ggc	144
Glu Ala Glu Val Thr Leu Glu Ala Gly Gly Ala Glu Gln Glu Pro Gly	
35 40 45	
cag gcg ctg ggg aaa gta ttc atg ggc tgc cct ggg caa gag cca gct	192
Gln Ala Leu Gly Lys Val Phe Met Gly Cys Pro Gly Gln Glu Pro Ala	
50 55 60	
ctg ttt agc act gat aat gat gac ttc act gtg cgg aat ggc gag aca	240
Leu Phe Ser Thr Asp Asn Asp Asp Phe Thr Val Arg Asn Gly Glu Thr	
65 70 75 80	
gtc cag gaa aga agg tca ctg aag gaa agg aat cca ttg aag atc ttc	288
Val Gln Glu Arg Arg Ser Leu Lys Glu Arg Asn Pro Leu Lys Ile Phe	
85 90 95	
cca tcc aaa cgt atc tta cga aga cac aag aga gat tgg gtg gtt gct	336
Pro Ser Lys Arg Ile Leu Arg Arg His Lys Arg Asp Trp Val Val Ala	
100 105 110	
cca ata tct gtc cct gaa aat ggc aag ggt ccc ttc ccc cag aga ctg	384
Pro Ile Ser Val Pro Glu Asn Gly Lys Gly Pro Phe Pro Gln Arg Leu	
115 120 125	
aat cag ctc aag tct aat aaa gat aga gac acc aag att ttc tac agc	432
Asn Gln Leu Lys Ser Asn Lys Asp Arg Asp Thr Lys Ile Phe Tyr Ser	
130 135 140	
atc acg ggg ccg ggg gca gac agc ccc cct gag ggt gtc ttc gct gta	480
Ile Thr Gly Pro Gly Ala Asp Ser Pro Pro Glu Gly Val Phe Ala Val	
145 150 155 160	
gag aag gag aca ggc tgg ttg ttg ttg aat aag cca ctg gac cgg gag	528
Glu Lys Glu Thr Gly Trp Leu Leu Leu Asn Lys Pro Leu Asp Arg Glu	
165 170 175	
gag att gcc aag tat gag ctc ttt ggc cac gct gtg tca gag aat ggt	576
Glu Ile Ala Lys Tyr Glu Leu Phe Gly His Ala Val Ser Glu Asn Gly	
180 185 190	
gcc tca gtg gag gac ccc atg aac atc tcc atc atc gtg acc gac cag	624
Ala Ser Val Glu Asp Pro Met Asn Ile Ser Ile Ile Val Thr Asp Gln	
195 200 205	
aat gac cac aag ccc aag ttt acc cag gac acc ttc cga ggg agt gtc	672
Asn Asp His Lys Pro Lys Phe Thr Gln Asp Thr Phe Arg Gly Ser Val	
210 215 220	
tta gag gga gtc cta cca ggt act tct gtg atg cag gtg aca gcc acg	720
Leu Glu Gly Val Leu Pro Gly Thr Ser Val Met Gln Val Thr Ala Thr	
225 230 235 240	
gat gag gat gat gcc atc tac acc tac aat ggg gtg gtt gct tac tcc	768
Asp Glu Asp Asp Ala Ile Tyr Thr Tyr Asn Gly Val Val Ala Tyr Ser	
245 250 255	
atc cat agc caa gaa cca aag gac cca cac gac ctc atg ttc acc att	816

ES 2 931 477 T3

Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile	
			260					265					270			
cac	cgg	agc	aca	ggc	acc	atc	agc	gtc	atc	tcc	agt	ggc	ctg	gac	cgg	864
His	Arg	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg	
		275					280					285				
gaa	aaa	gtc	cct	gag	tac	aca	ctg	acc	atc	cag	gcc	aca	gac	atg	gat	912
Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp	
	290						295				300					
ggg	gac	ggc	tcc	acc	acc	acg	gca	gtg	gca	gta	gtg	gag	atc	ctt	gat	960
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp	
305					310				315						320	
gcc	aat	gac	aat	gct	ccc	atg	ttt	gac	ccc	cag	aag	tac	gag	gcc	cat	1008
Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Met	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	His	
			325					330						335		
gtg	cct	gag	aat	gca	gtg	ggc	cat	gag	gtg	cag	agg	ctg	acg	gtc	act	1056
Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr	
			340					345					350			
gat	ctg	gac	gcc	ccc	aac	tca	cca	gcg	tgg	cgt	gcc	acc	tac	ctt	atc	1104
Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile	
			355				360					365				
atg	ggc	ggt	gac	gac	ggg	gac	cat	ttt	acc	atc	acc	acc	cac	cct	gag	1152
Met	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	His	Pro	Glu	
	370					375					380					
agc	aac	cag	ggc	atc	ctg	aca	acc	agg	aag	ggt	ttg	gat	ttt	gag	gcc	1200
Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	
385					390				395						400	
aaa	aac	cag	cac	acc	ctg	tac	gtt	gaa	gtg	acc	aac	gag	gcc	cct	ttt	1248
Lys	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe	
			405					410						415		
gtg	ctg	aag	ctc	cca	acc	tcc	aca	gcc	acc	ata	gtg	gtc	cac	gtg	gag	1296
Val	Leu	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu	
			420					425					430			
gat	gtg	aat	gag	gca	cct	gtg	ttt	gtc	cca	ccc	tcc	aaa	gtc	gtt	gag	1344
Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu	
			435				440					445				
gtc	cag	gag	ggc	atc	ccc	act	ggg	gag	cct	gtg	tgt	gtc	tac	act	gca	1392
Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala	
	450				455						460					
gaa	gac	cct	gac	aag	gag	aat	caa	aag	atc	agc	tac	cgc	atc	ctg	aga	1440
Glu	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg	
465					470				475						480	
gac	cca	gca	ggg	tgg	cta	gcc	atg	gac	cca	gac	agt	ggg	cag	gtc	aca	1488
Asp	Pro	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Met	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Thr	
			485					490						495		
gct	gtg	ggc	acc	ctc	gac	cgt	gag	gat	gag	cag	ttt	gtg	agg	aac	aac	1536
Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Arg	Asn	Asn	
			500					505					510			
atc	tat	gaa	gtc	atg	gtc	ttg	gcc	atg	gac	aat	gga	agc	cct	ccc	acc	1584
Ile	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala	Met	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr	
			515				520					525				
act	ggc	acg	gga	acc	ctt	ctg	cta	aca	ctg	att	gat	gtc	aat	gac	cat	1632
Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asp	His	
	530				535						540					
ggc	cca	gtc	cct	gag	ccc	cgt	cag	atc	acc	atc	tgc	aac	caa	agc	cct	1680
Gly	Pro	Val	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln	Ile	Thr	Ile	Cys	Asn	Gln	Ser	Pro	
545					550					555					560	
gtg	cgc	cag	gtg	ctg	aac	atc	acg	gac	aag	gac	ctg	tct	ccc	cac	acc	1728
Val	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	His	Thr	
			565					570						575		
tcc	cct	ttc	cag	gcc	cag	ctc	aca	gat	gac	tca	gac	atc	tac	tgg	acg	1776
Ser	Pro	Phe	Gln	Ala	Gln	Leu	Thr	Asp	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Trp	Thr	
			580					585					590			
gca	gag	gtc	aac	gag	gaa	ggt	gac	aca	gtg	gtc	ttg	tcc	ctg	aag	aag	1824

Ala	Glu	Val	Asn	Glu	Glu	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys	
		595					600					605				
ttc	ctg	aag	cag	gat	aca	tat	gac	gtg	cac	ctt	tct	ctg	tct	gac	cat	1872
Phe	Leu	Lys	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asp	Val	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	His	
		610					615					620				
ggc	aac	aaa	gag	cag	ctg	acg	gtg	atc	agg	gcc	act	gtg	tgc	gac	tgc	1920
Gly	Asn	Lys	Glu	Gln	Leu	Thr	Val	Ile	Arg	Ala	Thr	Val	Cys	Asp	Cys	
		625				630				635					640	
cat	ggc	cat	gtc	gaa	acc	tgc	cct	gga	ccc	tgg	aag	gga	ggg	ttc	atc	1968
His	Gly	His	Val	Glu	Thr	Cys	Pro	Gly	Pro	Trp	Lys	Gly	Gly	Phe	Ile	
				645					650					655		
ctc	cct	gtg	ctg	ggg	gct	gtc	ctg	gct	ctg	ctg	ttc	ctc	ctg	ctg	gtg	2016
Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Val	
				660				665					670			
ctg	ctt	ttg	ttg	gtg	aga	aag	aag	cgg	aag	atc	aag	gag	ccc	ctc	cta	2064
Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Arg	Lys	Lys	Arg	Lys	Ile	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	
				675			680					685				
ctc	cca	gaa	gat	gac	acc	cgt	gac	aac	gtc	ttc	tac	tat	ggc	gaa	gag	2112
Leu	Pro	Glu	Asp	Asp	Thr	Arg	Asp	Asn	Val	Phe	Tyr	Tyr	Gly	Glu	Glu	
						695					700					
ggg	ggt	ggc	gaa	gag	gac	cag	gac	tat	gac	atc	acc	cag	ctc	cac	cga	2160
Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	Tyr	Asp	Ile	Thr	Gln	Leu	His	Arg	
					710					715					720	
ggt	ctg	gag	gcc	agg	ccg	gag	gtg	gtt	ctc	cgc	aat	gac	gtg	gca	cca	2208
Gly	Leu	Glu	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Val	Leu	Arg	Asn	Asp	Val	Ala	Pro	
				725					730					735		
acc	atc	atc	ccg	aca	ccc	atg	tac	cgt	cct	cgg	cca	gcc	aac	cca	gat	2256
Thr	Ile	Ile	Pro	Thr	Pro	Met	Tyr	Arg	Pro	Arg	Pro	Ala	Asn	Pro	Asp	
			740				745					750				
gaa	atc	ggc	aac	ttt	ata	att	gag	aac	ctg	aag	gcg	gct	aac	aca	gac	2304
Glu	Ile	Gly	Asn	Phe	Ile	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Ala	Ala	Asn	Thr	Asp	
			755				760					765				
ccc	aca	gcc	ccg	ccc	tac	gac	acc	ctc	ttg	gtg	ttc	gac	tat	gag	ggc	2352
Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Tyr	Asp	Thr	Leu	Leu	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Gly	
			770			775					780					
agc	ggc	tcc	gac	gcc	gcg	tcc	ctg	agc	tcc	ctc	acc	tcc	tcc	gcc	tcc	2400
Ser	Gly	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Ser	Ala	Ser	
					790					795					800	
gac	caa	gac	caa	gat	tac	gat	tat	ctg	aac	gag	tgg	ggc	agc	cgc	ttc	2448
Asp	Gln	Asp	Gln	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Asn	Glu	Trp	Gly	Ser	Arg	Phe	
				805			810							815		
aag	aag	ctg	gca	gac	atg	tac	ggt	ggc	ggg	gag	gac	gac	tag			2490
Lys	Lys	Leu	Ala	Asp	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Glu	Asp	Asp				
			820				825									

<210> 2
 <211> 829
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 2

ES 2 931 477 T3

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

Pro	Ile	Ser	Val	Pro	Glu	Asn	Gly	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Gln	Arg	Leu
		115					120					125			
Asn	Gln	Leu	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Arg	Asp	Thr	Lys	Ile	Phe	Tyr	Ser
		130					135					140			
Ile	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Ser	Pro	Pro	Glu	Gly	Val	Phe	Ala	Val
		145				150				155					160
Glu	Lys	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Leu	Leu	Asn	Lys	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu
				165					170					175	
Glu	Ile	Ala	Lys	Tyr	Glu	Leu	Phe	Gly	His	Ala	Val	Ser	Glu	Asn	Gly
			180					185					190		
Ala	Ser	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Asn	Ile	Ser	Ile	Ile	Val	Thr	Asp	Gln
			195				200					205			
Asn	Asp	His	Lys	Pro	Lys	Phe	Thr	Gln	Asp	Thr	Phe	Arg	Gly	Ser	Val
		210				215					220				
Leu	Glu	Gly	Val	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Gln	Val	Thr	Ala	Thr
				225		230				235					240
Asp	Glu	Asp	Asp	Ala	Ile	Tyr	Thr	Tyr	Asn	Gly	Val	Val	Ala	Tyr	Ser
				245					250					255	
Ile	His	Ser	Gln	Glu	Pro	Lys	Asp	Pro	His	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	Ile
			260				265						270		
His	Arg	Ser	Thr	Gly	Thr	Ile	Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Leu	Asp	Arg
		275					280					285			
Glu	Lys	Val	Pro	Glu	Tyr	Thr	Leu	Thr	Ile	Gln	Ala	Thr	Asp	Met	Asp
		290				295				300					
Gly	Asp	Gly	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Val	Ala	Val	Val	Glu	Ile	Leu	Asp
		305				310			315						320
Ala	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Met	Phe	Asp	Pro	Gln	Lys	Tyr	Glu	Ala	His
			325					330						335	
Val	Pro	Glu	Asn	Ala	Val	Gly	His	Glu	Val	Gln	Arg	Leu	Thr	Val	Thr
			340				345						350		
Asp	Leu	Asp	Ala	Pro	Asn	Ser	Pro	Ala	Trp	Arg	Ala	Thr	Tyr	Leu	Ile
		355					360					365			
Met	Gly	Gly	Asp	Asp	Gly	Asp	His	Phe	Thr	Ile	Thr	Thr	His	Pro	Glu
		370				375					380				
Ser	Asn	Gln	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala
		385				390				395					400
Lys	Asn	Gln	His	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Val	Thr	Asn	Glu	Ala	Pro	Phe
			405					410						415	
Val	Leu	Lys	Leu	Pro	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Ile	Val	Val	His	Val	Glu
			420					425					430		
Asp	Val	Asn	Glu	Ala	Pro	Val	Phe	Val	Pro	Pro	Ser	Lys	Val	Val	Glu
		435					440					445			
Val	Gln	Glu	Gly	Ile	Pro	Thr	Gly	Glu	Pro	Val	Cys	Val	Tyr	Thr	Ala
		450				455				460					
Glu	Asp	Pro	Asp	Lys	Glu	Asn	Gln	Lys	Ile	Ser	Tyr	Arg	Ile	Leu	Arg
		465				470				475					480
Asp	Pro	Ala	Gly	Trp	Leu	Ala	Met	Asp	Pro	Asp	Ser	Gly	Gln	Val	Thr
			485					490						495	
Ala	Val	Gly	Thr	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Glu	Gln	Phe	Val	Arg	Asn	Asn
			500					505					510		
Ile	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Leu	Ala	Met	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Pro	Thr
		515					520					525			
Thr	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Thr	Leu	Ile	Asp	Val	Asn	Asp	His
		530				535					540				
Gly	Pro	Val	Pro	Glu	Pro	Arg	Gln	Ile	Thr	Ile	Cys	Asn	Gln	Ser	Pro
				545		550				555					560
Val	Arg	Gln	Val	Leu	Asn	Ile	Thr	Asp	Lys	Asp	Leu	Ser	Pro	His	Thr
			565					570						575	
Ser	Pro	Phe	Gln	Ala	Gln	Leu	Thr	Asp	Asp	Ser	Asp	Ile	Tyr	Trp	Thr
			580					585					590		
Ala	Glu	Val	Asn	Glu	Glu	Gly	Asp	Thr	Val	Val	Leu	Ser	Leu	Lys	Lys
		595					600					605			
Phe	Leu	Lys	Gln	Asp	Thr	Tyr	Asp	Val	His	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	His

610		615		620
Gly Asn Lys Glu Gln Leu Thr Val Ile Arg Ala Thr Val Cys Asp Cys				
625		630		640
His Gly His Val Glu Thr Cys Pro Gly Pro Trp Lys Gly Gly Phe Ile				
	645		650	655
Leu Pro Val Leu Gly Ala Val Leu Ala Leu Leu Phe Leu Leu Leu Val				
	660		665	670
Leu Leu Leu Leu Val Arg Lys Lys Arg Lys Ile Lys Glu Pro Leu Leu				
	675		680	685
Leu Pro Glu Asp Asp Thr Arg Asp Asn Val Phe Tyr Tyr Gly Glu Glu				
	690		695	700
Gly Gly Gly Glu Glu Asp Gln Asp Tyr Asp Ile Thr Gln Leu His Arg				
705		710		720
Gly Leu Glu Ala Arg Pro Glu Val Val Leu Arg Asn Asp Val Ala Pro				
	725		730	735
Thr Ile Ile Pro Thr Pro Met Tyr Arg Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp				
	740		745	750
Glu Ile Gly Asn Phe Ile Ile Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asn Thr Asp				
	755		760	765
Pro Thr Ala Pro Pro Tyr Asp Thr Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly				
	770		775	780
Ser Gly Ser Asp Ala Ala Ser Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ser Ala Ser				
785		790		800
Asp Gln Asp Gln Asp Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Ser Arg Phe				
	805		810	815
Lys Lys Leu Ala Asp Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp				
	820		825	

<210> 3
 <211> 2040
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 3

agtggcgctcg	gaactgcaaaa	gcacctgtga	gcttgccgaa	gtcagttcag	actccagccc	60
gctccagccc	ggccccgacc	gaccgcaccc	ggcgctgcc	ctcgctcggc	gtccccggcc	120
agccatgggc	ccttgagacc	gcagcctctc	ggcgctgctg	ctgctgctgc	aggtctcctc	180
ttggctctgc	caggagccgg	agccctgcc	ccctggcttt	gacgccgaga	gctacacggt	240
cacggtgccc	cggcgccacc	tggagagagg	ccgcgtcctg	ggcagagtga	atdddgaaga	300
ttgcaccggt	cgacaaaagg	cagcctatdt	ttccctcgac	acccgattca	aagtgggcac	360
agatggtgtg	attacagtca	aaaggcctct	acggtttcat	aaccacaga	tccatdtctt	420
ggtctacgcc	tgggactcca	cctacagaaa	gttttccacc	aaagtcacgc	tgaatacagt	480
ggggcaccac	caccgcccc	cgccccatca	ggcctccgtt	tctggaatcc	aagcagaatt	540
gctcacatdt	cccaactcct	ctcctggcct	cagaagacag	aagagagact	gggttattcc	600
tcccatcagc	tggccagaaa	atgaaaaagg	cccatttctt	aaaaacctgg	ttcagatcaa	660
atccaacaaa	gacaaaagg	gcaaggtdtt	ctacagcatc	actggccaag	gagctgacac	720
acccctgtgt	ggtgtcttta	ttattgaaag	agaaacagga	tggctgaagg	tgacagagcc	780
tctggataga	gaacgcattg	ccacatacac	tctcttctct	cacgtgtgt	catccaacgg	840
gaatgcagtt	gaggatccaa	tggagatdt	gatcacggt	accgatcaga	atgacaacaa	900
gcccgaatdt	acccaggagg	tctttaaggg	gtctgtcatg	gaaggtgctc	ttccaggaac	960
ctctgtgatg	gaggtcacag	ccacagacgc	ggacgatgat	gtgaacacct	acaatgccgc	1020
catcgcttac	accatcctca	gccaagatcc	tgagctccct	gacaaaaata	tgttcaccat	1080
taacaggaac	acaggagtca	tcagtgtggt	caccactggg	ctggaccgag	agagtdtccc	1140
tacgtatacc	ctggtggttc	aagctgctga	ccttcaagg	gaggggttaa	gcacaacagc	1200
aacagctgtg	atcacagtca	ctgacaccaa	cgataatcct	ccgatcttca	atcccaccac	1260
gtacaagggt	caggtgcctg	agaacgaggc	taacgtcgta	atcaccacac	tgaaagtgac	1320
tgatgctgat	gcccccaata	ccccagcgtg	ggaggctgta	tacaccatat	tgaatgatga	1380
tgggtggacaa	tttgtcgtca	ccacaaatcc	agtgaacaac	gatggcattt	tgaaaacagc	1440
aaagggtctg	gatttttgagg	ccaagcagca	gtacattcta	cacgtagcag	tgacgaatgt	1500
ggtaccttdt	gaggtctctc	tcaccacctc	cacagccacc	gtcaccgtgg	atgtgctgga	1560
tgtgaatgaa	gcccccatct	ttgtgcctcc	tgaaaagaga	gtggaagtgt	ccgaggactt	1620
tggcgtgggc	caggaaatca	catcctacac	tgcccaggag	ccagacacat	ttatggaaca	1680
gaaaataaca	tatcggatdt	ggagagacac	tgccaactgg	ctggagatta	atccggacac	1740
tgggtgccatt	tccactcggg	ctgagctgga	caggaggat	tttgagcacg	tgaagaacag	1800
cacgtacaca	gccctaataca	tagctacaga	caatggttct	ccagttgcta	ctggaacagg	1860
gacacttctg	ctgatcctgt	ctgatgtgaa	tgacaacgcc	cccataccag	aacctcgaac	1920
tatattcttc	tgtgagagga	atccaaagcc	tcaggtcata	aacatcattg	atgcagacct	1980
tcctcccaat	acatctccct	tcacagcaga	actaacacac	ggggcgagtg	ccaactggac	2040

<210> 4

5 <211> 882

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 4

Met	Gly	Pro	Trp	Ser	Arg	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gln			
1				5					10					15				
Val	Ser	Ser	Trp	Leu	Cys	Gln	Glu	Pro	Glu	Pro	Cys	His	Pro	Gly	Phe			
			20					25					30					
Asp	Ala	Glu	Ser	Tyr	Thr	Phe	Thr	Val	Pro	Arg	Arg	His	Leu	Glu	Arg			
			35					40				45						
Gly	Arg	Val	Leu	Gly	Arg	Val	Asn	Phe	Glu	Asp	Cys	Thr	Gly	Arg	Gln			
			50			55					60							
Arg	Thr	Ala	Tyr	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Arg	Phe	Lys	Val	Gly	Thr	Asp			
65					70					75					80			
Gly	Val	Ile	Thr	Val	Lys	Arg	Pro	Leu	Arg	Phe	His	Asn	Pro	Gln	Ile			
				85					90					95				
His	Phe	Leu	Val	Tyr	Ala	Trp	Asp	Ser	Thr	Tyr	Arg	Lys	Phe	Ser	Thr			
			100					105					110					
Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Thr	Val	Gly	His	His	His	Arg	Pro	Pro	Pro	His			
			115				120					125						
Gln	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ile	Gln	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn			
			130			135					140							
Ser	Ser	Pro	Gly	Leu	Arg	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp	Trp	Val	Ile	Pro	Pro			
145					150					155					160			
Ile	Ser	Cys	Pro	Glu	Asn	Glu	Lys	Gly	Pro	Phe	Pro	Lys	Asn	Leu	Val			
				165					170					175				
Gln	Ile	Lys	Ser	Asn	Lys	Asp	Lys	Glu	Gly	Lys	Val	Phe	Tyr	Ser	Ile			
			180				185						190					
Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Asp	Thr	Pro	Pro	Val	Gly	Val	Phe	Ile	Ile	Glu			
			195				200					205						
Arg	Glu	Thr	Gly	Trp	Leu	Lys	Val	Thr	Glu	Pro	Leu	Asp	Arg	Glu	Arg			
			210			215					220							
Ile	Ala	Thr	Tyr	Thr	Leu	Phe	Ser	His	Ala	Val	Ser	Ser	Asn	Gly	Asn			
225					230					235					240			
Ala	Val	Glu	Asp	Pro	Met	Glu	Ile	Leu	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Gln	Asn			
				245					250					255				
Asp	Asn	Lys	Pro	Glu	Phe	Thr	Gln	Glu	Val	Phe	Lys	Gly	Ser	Val	Met			
			260					265					270					
Glu	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Thr	Ser	Val	Met	Glu	Val	Thr	Ala	Thr	Asp			
			275				280					285						
Ala	Asp	Asp	Asp	Val	Asn	Thr	Tyr	Asn	Ala	Ala	Ile	Ala	Tyr	Thr	Ile			
			290			295					300							
Leu	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	Leu	Pro	Asp	Lys	Asn	Met	Phe	Thr	Ile	Asn			
305					310					315					320			
Arg	Asn	Thr	Gly	Val	Ile	Ser	Val	Val	Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu			
				325					330					335				
Ser	Phe	Pro	Thr	Tyr	Thr	Leu	Val	Val	Gln	Ala	Ala	Asp	Leu	Gln	Gly			
			340					345					350					
Glu	Gly	Leu	Ser	Thr	Thr	Ala	Thr	Ala	Val	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Thr			
			355				360					365						
Asn	Asp	Asn	Pro	Pro	Ile	Phe	Asn	Pro	Thr	Thr	Tyr	Lys	Gly	Gln	Val			
			370			375					380							
Pro	Glu	Asn	Glu	Ala	Asn	Val	Val	Ile	Thr	Thr	Leu	Lys	Val	Thr	Asp			
385					390					395					400			
Ala	Asp	Ala	Pro	Asn	Thr	Pro	Ala	Trp	Glu	Ala	Val	Tyr	Thr	Ile	Leu			
				405					410					415				
Asn	Asp	Asp	Gly	Gly	Gln	Phe	Val	Val	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Asn	Asn			
			420					425					430					
Asp	Gly	Ile	Leu	Lys	Thr	Ala	Lys	Gly	Leu	Asp	Phe	Glu	Ala	Lys	Gln			

		435					440					445				
Gln	Tyr	Ile	Leu	His	Val	Ala	Val	Thr	Asn	Val	Val	Pro	Phe	Glu	Val	
	450					455					460					
Ser	Leu	Thr	Thr	Ser	Thr	Ala	Thr	Val	Thr	Val	Asp	Val	Leu	Asp	Val	
465					470					475					480	
Asn	Glu	Ala	Pro	Ile	Phe	Val	Pro	Pro	Glu	Lys	Arg	Val	Glu	Val	Ser	
				485					490					495		
Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Gly	Gln	Glu	Ile	Thr	Ser	Tyr	Thr	Ala	Gln	Glu	
			500					505					510			
Pro	Asp	Thr	Phe	Met	Glu	Gln	Lys	Ile	Thr	Tyr	Arg	Ile	Trp	Arg	Asp	
		515					520					525				
Thr	Ala	Asn	Trp	Leu	Glu	Ile	Asn	Pro	Asp	Thr	Gly	Ala	Ile	Ser	Thr	
	530					535					540					
Arg	Ala	Glu	Leu	Asp	Arg	Glu	Asp	Phe	Glu	His	Val	Lys	Asn	Ser	Thr	
545					550					555					560	
Tyr	Thr	Ala	Leu	Ile	Ile	Ala	Thr	Asp	Asn	Gly	Ser	Pro	Val	Ala	Thr	
				565					570					575		
Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Leu	Ile	Leu	Ser	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Ala	
			580					585					590			
Pro	Ile	Pro	Glu	Pro	Arg	Thr	Ile	Phe	Phe	Cys	Glu	Arg	Asn	Pro	Lys	
		595					600					605				
Pro	Gln	Val	Ile	Asn	Ile	Ile	Asp	Ala	Asp	Leu	Pro	Pro	Asn	Thr	Ser	
	610					615					620					
Pro	Phe	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	His	Gly	Ala	Ser	Ala	Asn	Trp	Thr	Ile	
625					630					635					640	
Gln	Tyr	Asn	Asp	Pro	Thr	Gln	Glu	Ser	Ile	Ile	Leu	Lys	Pro	Lys	Met	
				645					650					655		
Ala	Leu	Glu	Val	Gly	Asp	Tyr	Lys	Ile	Asn	Leu	Lys	Leu	Met	Asp	Asn	
			660					665					670			
Gln	Asn	Lys	Asp	Gln	Val	Thr	Thr	Leu	Glu	Val	Ser	Val	Cys	Asp	Cys	
		675					680					685				
Glu	Gly	Ala	Ala	Gly	Val	Cys	Arg	Lys	Ala	Gln	Pro	Val	Glu	Ala	Gly	
	690					695					700					
Leu	Gln	Ile	Pro	Ala	Ile	Leu	Gly	Ile	Leu	Gly	Gly	Ile	Leu	Ala	Leu	
705					710					715					720	
Leu	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Arg	Arg	Arg	Ala	Val	
			725						730					735		
Val	Lys	Glu	Pro	Leu	Leu	Pro	Pro	Glu	Asp	Asp	Thr	Arg	Asp	Asn	Val	
			740					745				750				
Tyr	Tyr	Tyr	Asp	Glu	Glu	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	Phe	Asp		
		755					760				765					
Leu	Ser	Gln	Leu	His	Arg	Gly	Leu	Asp	Ala	Arg	Pro	Glu	Val	Thr	Arg	
	770					775					780					
Asn	Asp	Val	Ala	Pro	Thr	Leu	Met	Ser	Val	Pro	Arg	Tyr	Leu	Pro	Arg	
785					790											

<210> 5
<211> 4380
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
<400> 5

ggggagcgcc	atccgctcca	cttccacctc	cacatcctcc	accggccaag	gtccccgcgc	60
ctgcatccct	cgcggtcttc	gctgcgctcc	gggcccggagc	cgagccgcct	gcgctgccac	120
agcagccgcc	tccacacact	cgcagacgct	cacacgctct	ccctccctgt	tcccccgccc	180
cctccccagc	tccttgatct	ctgggtctgt	tttattactc	ctgggtgcgag	tccccgcggac	240
tccgcccggc	gctatttgct	atcagctcgc	tctccattgg	cggggagcgg	agagcagcga	300
agaagggggt	ggggagggga	ggggaaggga	aggggggtgga	aactgcctgg	agccgtttct	360
ccgcgcgcgt	gttggtgctg	ccgctgcctc	ctcctcctcc	gccgcgcgcg	ccgcgcgcgc	420
cgctcctcc	ggctcttcgc	tgcgcccctc	tccgcctcca	tgtgccggat	agcgggagcg	480
ctgoggaccc	tgctgccgct	gctggcgggc	ctgcttcagg	cgtctgtaga	ggcttctggt	540
gaaatcgcat	tatgcaagac	tggatttcct	gaagatgttt	acagtgcagt	cttatcgaa	600
gatgtgcatg	aaggacagcc	tcttctcaat	gtgaagttta	gcaactgcaa	tggaaaaaga	660
aaagtacaat	atgagagcag	tgagcctgca	gattttaagg	tggatgaaga	tggcatggtg	720
tatgccgtga	gaagctttcc	actctcttct	gagcatgcca	agttcctgat	atatgcccac	780
gacaaagaga	cccaggaaaa	gtggcaagtg	gcagtaaaat	tgagcctgaa	gccaacctta	840
actgaggagt	cagtgaagga	gtcagcagaa	gttgaagaaa	tagtgttccc	aagacaattc	900
agtaagcaca	gtggccacct	acaaaggcag	aagagagact	gggtcatccc	tccaatcaac	960
ttgccagaaa	actccagggg	accttttctt	caagagcttg	tcaggatcag	gtctgataga	1020
gataaaaaac	tttactgctg	gtacagtgtg	actgggccag	gagctgacca	gcctccaact	1080
ggtatcttca	ttatcaaccc	catctcgggt	cagctgtcgg	tgacaaagcc	cctggatcgc	1140
gagcagatag	cccggtttca	tttgagggca	catgcagtag	atattaatgg	aaatcaagtg	1200
gagaacccca	ttgacattgt	catcaatggt	attgacatga	atgacaacag	acctgagttc	1260
ttacaccagg	tttggaatgg	gacagttcct	gagggatcaa	agcctggaac	atatgtgatg	1320
accgtaacag	caattgatgc	tgacgatccc	aatgccctca	atgggatgtt	gaggtacaga	1380
atcgtgtctc	aggctccaag	caccccttca	cccaacatgt	ttacaatcaa	caatgagact	1440
ggtgacatca	tcacagtggc	agctggactt	gatcgagaaa	aagtgaaca	gtatacgtta	1500
ataattcaag	ctacagacat	ggaaggcaat	cccacatatg	gcctttcaaa	cacagccacg	1560
gccgtcatca	cagtgcagaa	tgtcaatgac	aatcctccag	agtttactgc	catgacgttt	1620
tatggtgaag	ttcctgagaa	cagggtagac	atcatagtag	ctaactaac	tgtgaccgat	1680
aaggatcaac	cccatacacc	agcctggaac	gcagtgtaca	gaatcagtgg	cggagatcct	1740
actggacggt	tcgccatcca	gaccgaccca	aacagcaacg	acgggttagt	caccgtgggtc	1800
aaaccaatcg	actttgaaac	aaataggatg	tttgtcctta	ctgttgctgc	agaaaatcaa	1860
gtgccattag	ccaagggaat	tcagcaccgg	cctcagtcac	ctgcaaccgt	gtctgttaca	1920
gttaattgacg	taaatgaaaa	cccttatttt	gcccccaatc	ctaagatcat	tcgccaagaa	1980
gaagggtctc	atgccggtac	catgttgaca	acattcactg	ctcaggaccc	agatcgatat	2040
atgcagcaaa	atattagata	cactaaatta	tctgatcctg	ccaattggct	aaaaatagat	2100
cctgtgaatg	gacaaataac	tacaattgct	gttttgacc	gagaatcacc	aaatgtgaaa	2160
aacaatatat	ataatgctac	tttccttgct	tctgacaatg	gaattcctcc	tatgagtggg	2220
acaggaacgc	tgacagatcta	tttacttgat	attaatgaca	atgcccctca	agtgttacct	2280
caagaggcag	agacttgcca	aactccagac	cccaattcaa	ttaatattac	agcacttgat	2340
tatgacattg	atccaaatgc	tggaaccattt	gcttttgatc	ttcctttatc	tccagtgaat	2400
attaagagaa	attggaccat	cactcggctt	aatgggtgatt	ttgctcagct	taatttaaa	2460
ataaaatttc	ttgaagctgg	tatctatgaa	gttcccatca	taatcacaga	ttcgggtaat	2520
cctcccaaat	caaataattc	catcctgcgc	gtgaagggtt	gccagtgtga	ctccaacggg	2580
gactgcacag	atgtggacag	gattgtgggt	gcggggcttg	gcaccggtgc	catcattgcc	2640
atcctgctct	gcatcatcat	cctgcttatc	cttggtgctga	tggttggtgt	atggatgaaa	2700
cgccgggata	aagaacgcca	ggccaaacaa	cttttaattg	atccagaaga	tgatgtaaga	2760
gataaatattt	taaaatatga	tgaagaagg	ggaggagaag	aagaccagga	ctatgacttg	2820
agccagctgc	agcagcctga	cactgtggag	cctgatgcca	tcaagcctgt	gggaatccga	2880
cgaatggatg	aaagacccat	ccacgcccag	cccagtatc	cggtcgcatc	tcagacccca	2940
caccctggag	acattgggga	cttcattaat	gagggcctta	aagcggctga	caatgacccc	3000
acagctccac	catatgactc	cctgttagtg	tttgactatg	aaggcagtgg	ctccactgct	3060
gggtccttga	gctcccttaa	ttcctcaagt	agtgggtggt	agcaggacta	tgattacctg	3120
aacgactggg	ggccacgggt	caagaaactt	gctgacatgt	atgggtggag	tgatgactga	3180
acttcagggt	gaacttggtt	tttggaacag	tacaaacaat	ttcaactgat	attcccaaaa	3240
agcattcaga	agctaggctt	taactttgta	gtctactagc	acagtgcttg	ctggaggctt	3300
tggcataggg	tgcaaaccaa	tttgggctca	gagggaatat	cagtgatcca	tactgttttg	3360
aaaaacactg	acctgcagtt	cacttgaatt	ttacagtaga	gaagcactgg	gattttatgt	3420
gcctttttgt	acctttttca	gattggaatt	agttttctgt	ttaaggcttt	aatggtagct	3480
atcttctgaa	cgataagtaa	aagacaaaat	atcttctggt	gggagcagta	agttaaacca	3540
tgatatgctt	caacacgctt	ttgttacatt	gcatttgctt	ttattaaaat	acaaaattaa	3600
acaaacaaaa	aaactcatgg	agcgatttta	ttatcttggg	ggatgagacc	atgagattgg	3660
aaaatgtaca	ttacttctag	tttttagactt	tagtttggtt	tttttttttt	cactaaaatc	3720
ttaaaactta	ctcagctggt	tgcaaatata	gggagttttc	atatcaccaa	ttttagtaga	3780
aattgaattt	tttcataaac	tagaatgtta	gacacatttt	ggtcctaata	catgtacact	3840

ES 2 931 477 T3

tttttatttc	tgtatttttc	cacttcactg	taaaaatagt	atgtgtacat	aatgttttat	3900
tggcatagtc	tatggagaag	tcagaaaact	tcagaacatg	tgtatgtatt	atttggacta	3960
tggattcagg	ttttttgcat	gtttatatct	ttcgttatgg	ataaagtatt	tacaaaacag	4020
tgacatttga	ttcaattgtt	gagctgtagt	tagaatactc	aattttttaat	ttttttaatt	4080
tttttatttt	ttattttctt	tttggtttgg	ggagggagaa	aagttcttag	cacaaatggt	4140
ttacataatt	tgtaccaaaa	aaaaaaaaaa	aggaaaggaa	agaaaggggt	ggcctgacac	4200
tgggtggcact	actaagtgtg	tgttttttta	aaaaaaaaat	ggaaaaaaaa	aagcttttaa	4260
actggagaga	cttctgacaa	cagctttgcc	tctgtattgt	gtaccagaat	ataaatgata	4320
cacctctgac	cccagcgttc	tgaataaaat	gctaattttg	gatctggaaa	aaaaaaaaaa	4380

<210> 6

<211> 906

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Met	Cys	Arg	Ile	Ala	Gly	Ala	Leu	Arg	Thr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Ala
1				5					10					15	
Ala	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Val	Glu	Ala	Ser	Gly	Glu	Ile	Ala	Leu	Cys
			20					25					30		
Lys	Thr	Gly	Phe	Pro	Glu	Asp	Val	Tyr	Ser	Ala	Val	Leu	Ser	Lys	Asp
		35					40					45			
Val	His	Glu	Gly	Gln	Pro	Leu	Leu	Asn	Val	Lys	Phe	Ser	Asn	Cys	Asn
	50					55					60				
Gly	Lys	Arg	Lys	Val	Gln	Tyr	Glu	Ser	Ser	Glu	Pro	Ala	Asp	Phe	Lys
65					70					75					80
Val	Asp	Glu	Asp	Gly	Met	Val	Tyr	Ala	Val	Arg	Ser	Phe	Pro	Leu	Ser
				85					90					95	
Ser	Glu	His	Ala	Lys	Phe	Leu	Ile	Tyr	Ala	Gln	Asp	Lys	Glu	Thr	Gln
			100					105					110		
Glu	Lys	Trp	Gln	Val	Ala	Val	Lys	Leu	Ser	Leu	Lys	Pro	Thr	Leu	Thr
		115					120					125			
Glu	Glu	Ser	Val	Lys	Glu	Ser	Ala	Glu	Val	Glu	Glu	Ile	Val	Phe	Pro
	130					135					140				
Arg	Gln	Phe	Ser	Lys	His	Ser	Gly	His	Leu	Gln	Arg	Gln	Lys	Arg	Asp
145					150					155					160
Trp	Val	Ile	Pro	Pro	Ile	Asn	Leu	Pro	Glu	Asn	Ser	Arg	Gly	Pro	Phe
				165					170					175	
Pro	Gln	Glu	Leu	Val	Arg	Ile	Arg	Ser	Asp	Arg	Asp	Lys	Asn	Leu	Ser
			180					185					190		
Leu	Arg	Tyr	Ser	Val	Thr	Gly	Pro	Gly	Ala	Asp	Gln	Pro	Pro	Thr	Gly
		195				200						205			
Ile	Phe	Ile	Ile	Asn	Pro	Ile	Ser	Gly	Gln	Leu	Ser	Val	Thr	Lys	Pro
	210					215					220				
Leu	Asp	Arg	Glu	Gln	Ile	Ala	Arg	Phe	His	Leu	Arg	Ala	His	Ala	Val
225					230					235					240
Asp	Ile	Asn	Gly	Asn	Gln	Val	Glu	Asn	Pro	Ile	Asp	Ile	Val	Ile	Asn
				245					250					255	
Val	Ile	Asp	Met	Asn	Asp	Asn	Arg	Pro	Glu	Phe	Leu	His	Gln	Val	Trp
		260						265					270		
Asn	Gly	Thr	Val	Pro	Glu	Gly	Ser	Lys	Pro	Gly	Thr	Tyr	Val	Met	Thr
		275					280					285			
Val	Thr	Ala	Ile	Asp	Ala	Asp	Asp	Pro	Asn	Ala	Leu	Asn	Gly	Met	Leu
		290				295					300				
Arg	Tyr	Arg	Ile	Val	Ser	Gln	Ala	Pro	Ser	Thr	Pro	Ser	Pro	Asn	Met
305					310					315					320
Phe	Thr	Ile	Asn	Asn	Glu	Thr	Gly	Asp	Ile	Ile	Thr	Val	Ala	Ala	Gly
				325					330					335	
Leu	Asp	Arg	Glu	Lys	Val	Gln	Gln	Tyr	Thr	Leu	Ile	Ile	Gln	Ala	Thr
			340					345					350		
Asp	Met	Glu	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Asn	Thr	Ala	Thr	Ala
		355					360					365			
Val	Ile	Thr	Val	Thr	Asp	Val	Asn	Asp	Asn	Pro	Pro	Glu	Phe	Thr	Ala
	370					375					380				
Met	Thr	Phe	Tyr	Gly	Glu	Val	Pro	Glu	Asn	Arg	Val	Asp	Ile	Ile	Val

385					390					395					400
Ala	Asn	Leu	Thr	Val	Thr	Asp	Lys	Asp	Gln	Pro	His	Thr	Pro	Ala	Trp
				405					410					415	
Asn	Ala	Val	Tyr	Arg	Ile	Ser	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Gly	Arg	Phe	Ala
			420					425					430		
Ile	Gln	Thr	Asp	Pro	Asn	Ser	Asn	Asp	Gly	Leu	Val	Thr	Val	Val	Lys
		435					440					445			
Pro	Ile	Asp	Phe	Glu	Thr	Asn	Arg	Met	Phe	Val	Leu	Thr	Val	Ala	Ala
	450					455					460				
Glu	Asn	Gln	Val	Pro	Leu	Ala	Lys	Gly	Ile	Gln	His	Pro	Pro	Gln	Ser
465					470					475				480	
Thr	Ala	Thr	Val	Ser	Val	Thr	Val	Ile	Asp	Val	Asn	Glu	Asn	Pro	Tyr
			485						490					495	
Phe	Ala	Pro	Asn	Pro	Lys	Ile	Ile	Arg	Gln	Glu	Glu	Gly	Leu	His	Ala
			500					505					510		
Gly	Thr	Met	Leu	Thr	Thr	Phe	Thr	Ala	Gln	Asp	Pro	Asp	Arg	Tyr	Met
		515					520					525			
Gln	Gln	Asn	Ile	Arg	Tyr	Thr	Lys	Leu	Ser	Asp	Pro	Ala	Asn	Trp	Leu
	530					535					540				
Lys	Ile	Asp	Pro	Val	Asn	Gly	Gln	Ile	Thr	Thr	Ile	Ala	Val	Leu	Asp
545					550					555				560	
Arg	Glu	Ser	Pro	Asn	Val	Lys	Asn	Asn	Ile	Tyr	Asn	Ala	Thr	Phe	Leu
			565						570					575	
Ala	Ser	Asp	Asn	Gly	Ile	Pro	Pro	Met	Ser	Gly	Thr	Gly	Thr	Leu	Gln
			580					585					590		
Ile	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ile	Asn	Asp	Asn	Ala	Pro	Gln	Val	Leu	Pro	Gln
	595					600						605			
Glu	Ala	Glu	Thr	Cys	Glu	Thr	Pro	Asp	Pro	Asn	Ser	Ile	Asn	Ile	Thr
	610					615					620				
Ala	Leu	Asp	Tyr	Asp	Ile	Asp	Pro	Asn	Ala	Gly	Pro	Phe	Ala	Phe	Asp
625					630					635				640	
Leu	Pro	Leu	Ser	Pro	Val	Thr	Ile	Lys	Arg	Asn	Trp	Thr	Ile	Thr	Arg
			645						650					655	
Leu	Asn	Gly	Asp	Phe	Ala	Gln	Leu	Asn	Leu	Lys	Ile	Lys	Phe	Leu	Glu
		660						665					670		
Ala	Gly	Ile	Tyr	Glu	Val	Pro	Ile	Ile	Ile	Thr	Asp	Ser	Gly	Asn	Pro
	675						680					685			
Pro	Lys	Ser	Asn	Ile	Ser	Ile	Leu	Arg	Val	Lys	Val	Cys	Gln	Cys	Asp
	690					695					700				
Ser	Asn	Gly	Asp	Cys	Thr	Asp	Val	Asp	Arg	Ile	Val	Gly	Ala	Gly	Leu
705					710					715				720	
Gly	Thr	Gly	Ala	Ile	Ile	Ala	Ile	Leu	Leu	Cys	Ile	Ile	Ile	Leu	Leu
			725						730					735	
Ile	Leu	Val	Leu	Met	Phe	Val	Val	Trp	Met	Lys	Arg	Arg	Asp	Lys	Glu
		740						745					750		
Arg	Gln	Ala	Lys	Gln	Leu	Leu	Ile	Asp	Pro	Glu	Asp	Asp	Val	Arg	Asp
	755						760					765			
Asn	Ile	Leu	Lys	Tyr	Asp	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Glu	Asp	Gln	Asp	
	770					775					780				
Tyr	Asp	Leu	Ser	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Asp	Thr	Val	Glu	Pro	Asp	Ala
785					790					795				800	
Ile	Lys	Pro	Val	Gly	Ile	Arg	Arg	Met	Asp	Glu	Arg	Pro	Ile	His	Ala
			805						810					815	
Glu	Pro	Gln	Tyr	Pro	Val	Arg	Ser	Ala	Ala	Pro	His	Pro	Gly	Asp	Ile
		820						825					830		
Gly	Asp	Phe	Ile	Asn	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Ala	Asp	Asn	Asp	Pro	Thr
		835					840					845			
Ala	Pro	Pro	Tyr	Asp	Ser	Leu	Leu	Val	Phe	Asp	Tyr	Glu	Gly	Ser	Gly
	850					855				860					
Ser	Thr	Ala	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Ser	Ser	Ser	Ser	Gly	Gly
865					870					875				880	
Glu	Gln	Asp	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Asn	Asp	Trp	Gly	Pro	Arg	Phe	Lys	Lys
			885						890					895	
Leu	Ala	Asp	Met	Tyr	Gly	Gly	Gly	Asp	Asp						
			900					905							

	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 7	
10	cgcggtacca tggggctccc tcgt	24
	<210> 8	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 8	
	ccgtctagat aacctccctt ccagggtcc	29
20	<210> 9	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 9	
	tatggagctc ggtaccgatt ggggtggtgc tccaatatct g	41
30	<210> 10	
	<211> 44	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 10	
	agattaccta tctagactac tgcacacag aagtacctgg tagg	44
40	<210> 11	
	<211> 43	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 11	
45	tatggagctc ggtaccaagt ctaataaaga tagagacacc aag	43
50	<210> 12	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 12	
55	agattaccta tctagactac ctctgcacct catggccac tgcattctca	50
60	<210> 13	
	<211> 41	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 13	
	tatggagctc ggtaccgtga cagccacgga tgaggatgat g	41
65	<210> 14	
	<211> 41	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 14 agattaccta tctagactag acacacacag gctccccagt g	41
	<210> 15	
	<211> 38	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
15	<400> 15 tatggagctc ggtaccctga cggtcactga tctggacg	38
	<210> 16	
	<211> 47	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
25	<400> 16 agattaccta tctagactag ggctcaggga ctgggccatg gtcattg	47
	<210> 17	
	<211> 41	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 17 tatggagctc ggtacctaca ctgcagaaga ccctgacaag g	41
35	<210> 18	
	<211> 50	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 18 agattaccta tctagactaa cctccctcc aggtgccagg gcaggtttcg	50
45	<210> 19	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
50	<400> 19 gayatccagc tgactcagcc	20
	<210> 20	
	<211> 20	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
60	<400> 20 gayattgttc tcwcccagtc	20
	<210> 21	
	<211> 20	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 21 gayattgtgm tmactcagtc	20
5	<210> 22 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
10	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 22 gayattgtgy tracacagtc	20
15	<210> 23 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
20	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 23 gayattgtra tgacmcagtc	20
25	<210> 24 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 24 gayattmaga tramccagtc	20
35	<210> 25 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 25 gayattcaga tga ydcagtc	20
45	<210> 26 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
50	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 26 gayatycaga tgacacagac	20
55	<210> 27 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
60	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 27 gayattgttc tcawccagtc	20
65	<210> 28 <211> 20 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 28 gayattgwc tsaccaatc	20

	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 29	
10	gayattstra tgacccartc	20
	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 30	
	gayrtktga tgaccarac	20
20	<210> 31	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 31	
	gayattgtga tgacbcagkc	20
30	<210> 32	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 32	
	gayattgtga taacycagga	20
40	<210> 33	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 33	
45	gayattgtga tgaccagwt	20
50	<210> 34	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 34	
55	gayattgtga tgacacaacc	20
60	<210> 35	
	<211> 20	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 35	
	gayattttgc tgactcagtc	20
65	<210> 36	
	<211> 21	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 36	
	ggsaccaarc tggaaatmaa a	21
	<210> 37	
	<211> 21	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 37	
15	gggacaaagt tggaaataaa a	21
	<210> 38	
	<211> 21	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 38	
25	gggaccaagc tggagctgaa a	21
	<210> 39	
	<211> 24	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 39	
	atgragwcac akwcycaggt cttt	24
35	<210> 40	
	<211> 25	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 40	
	atggagacag acacactcct gctat	25
45	<210> 41	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
50	<400> 41	
	atggagwcag acacactsct gytatgggt	29
	<210> 42	
	<211> 32	
55	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 42	
60	atgaggrccc ctgctcagwt tyttggiwtc tt	32
	<210> 43	
	<211> 31	
	<212> ADN	
65	<213> Secuencia artificial	
	<220>	

	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 43 atgggcwtca agatgragtc acakwyycwg g	31
5	<210> 44 <211> 29 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
10	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 44 atgagtgtgc ycactcaggt cctgsgtt	29
15	<210> 45 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
20	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 45 atgtggggay cgktttyamm ctttcaatt g	31
25	<210> 46 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
30	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 46 atggaagccc cagctcagct tctcttc	28
35	<210> 47 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
40	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 47 atgagimmkt cimttcaitt cytggg	26
45	<210> 48 <211> 26 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
50	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 48 atgakgthcy cigctcagyt yctirg	26
55	<210> 49 <211> 25 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
60	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 49 atggtrtccw casctcagtt ccttg	25
65	<210> 50 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial <220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético <400> 50 atgtatatat gttgtgtgc tatttct	27

	<210> 51	
	<211> 29	
	<212> ADN	
5	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 51	
10	atgaagttgc ctgttaggct gttggtgct	29
	<210> 52	
	<211> 29	
	<212> ADN	
15	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 52	
	atggattwc argtcagat twtcagctt	29
20	<210> 53	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 53	
	atggtyctya tvtccttgct gttctgg	27
30	<210> 54	
	<211> 27	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
35	<400> 54	
	atggtyctya tvtrctgct gctatgg	27
40	<210> 55	
	<211> 21	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
45	<400> 55	
	actggatggt gggaagatgg a	21
50	<210> 56	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 56	
55	atggratgsa gctgkgmat sctctt	26
60	<210> 57	
	<211> 26	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 57	
	atgractcg ggytgagctk ggtttt	26
65	<210> 58	
	<211> 25	

	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
5	<400> 58	
	atggctgtct tggggctgct cttct	25
	<210> 59	
	<211> 18	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 59	
15	atggrcagrc ttacwtyy	18
	<210> 60	
	<211> 23	
	<212> ADN	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 60	
25	saggtsmarc tksagsagtc wgg	23
	<210> 61	
	<211> 19	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Descripción de secuencia artificial: ADN sintético	
	<400> 61	
	cascccatc dgtctatcc	19
35		

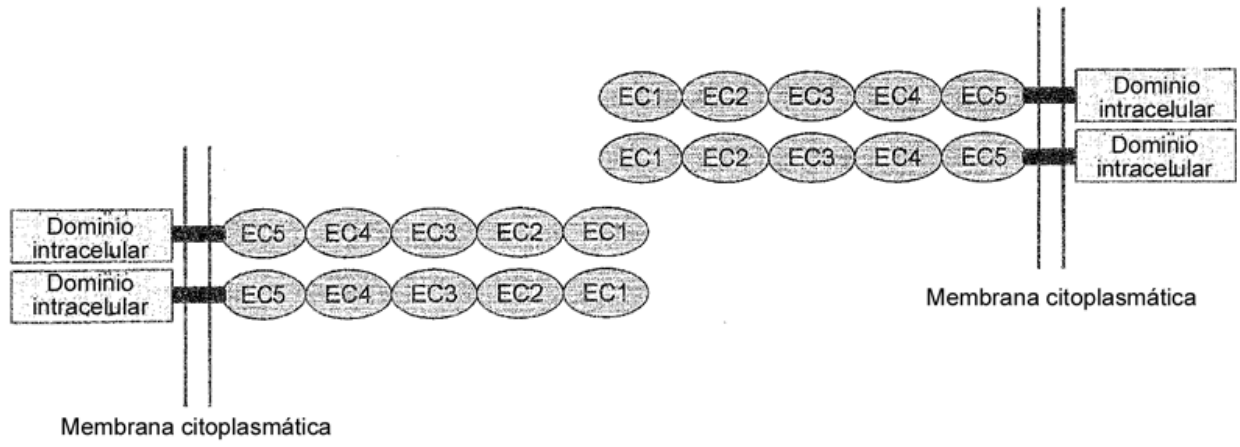
REIVINDICACIONES

1. Agente citotóxico que comprende un anticuerpo monoclonal IgG anti-p-cadherina, que reconoce un dominio de cadherina 1 (EC1) de p-cadherina y presenta una alta capacidad de internalización, en el que la alta capacidad de internalización es una viabilidad sometida a ensayo de células que expresan CDH3 que es del 60% o menos, cuando el anticuerpo se administra con un anticuerpo anti-IgG marcado con saporina, en el que la célula que expresa CDH3 es la línea celular de cáncer de mama HCC1954 (ATCC, CRL-2338), en el que se conjuga una sustancia citotóxica con el anticuerpo, y en el que la sustancia citotóxica es un derivado de maitansinoide seleccionado de DM1, DM3 o DM4 o un derivado de auristatina seleccionado de MMAE o MMAF.
2. Agente citotóxico según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
3. Agente citotóxico según la reivindicación 1 ó 2, en el que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano.
4. Agente citotóxico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el anticuerpo se conjuga con una sustancia citotóxica por medio de un ligador.
5. Agente citotóxico según la reivindicación 4, en el que el ligador se selecciona del grupo que consiste en: sulfosuccinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (sulfo-SMCC), *N*-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), *N*-succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster *N*-succinimidílico del ácido *rc*-maleimidoundecanoico (KMUA), éster *N*-succinimidílico del ácido γ -maleimidobutírico (GMBS), éster de *N*-hidroxisuccinimida del ácido ε -maleimidocaproico (EMCS), éster de *m*-maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS), éster de *N*-(α -maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(β -maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), *N*-succinimidil-4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), *N*-(*p*-maleimidofenil)isocianato (PMPI), 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), *p*-aminobenciloxicarbonilo (PAB), *N*-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP), *N*-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB), valina-citrulina (val-cit) y alanina-fenilalanina (ala-phe).
6. Composición farmacéutica que comprende, como principio activo, el agente citotóxico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.
7. Agente terapéutico para su uso en la terapia de una enfermedad con un CDH3 humano altamente expresado, que comprende, como principio activo, el agente citotóxico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que la enfermedad con un CDH3 humano altamente expresado se selecciona de cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon o cáncer pancreático.
8. Agente terapéutico para su uso según la reivindicación 7, en el que la enfermedad es cáncer de mama.

[Fig. 1]

E-cadherina_CDH1_	DWVIPPISCPENEKGFPPKNLVQIKSNKDEKGVFYSITGGADTPPVGVFI IERETGWL 60
P-cadherina_CDH3_	DWVVAPI SYPENGKGFPPQRLNQLKSNKDRDTKIFYSITGP GADSPPEGVFAVEKETGWL 60
N-cadherina_CDH2_	DWVIPPINLPENSRGFPQQLVRI RSDRDKNLSLRYSVTGP GADQPPTGIFI INPISGQL 60
E-cadherina_CDH1_	KVTEPLDRER IATYTLFSHAYSSNGNAVEDPME ILITVTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEG 120
P-cadherina_CDH3_	LLNKPLDREE IAKYELFGHAYSENGASYEDPMNIS IIVTDQNDHKPKFTQDTFRGSYLEG 120
N-cadherina_CDH2_	SVTKPLDREQIARFHLRAHAYDINGNQENPID IVINVIMNDNRPEFLHQVWNGTVPEG 120
E-cadherina_CDH1_	ALPGTSVMEVTATDADDVNTYNAATYTI LSQDPELPDKNHFT INRNTGVISYVTTGLD 180
P-cadherina_CDH3_	VLPGTSVMQVTATDEDDAI YTVNGVVAYSIHSQEPKDPHLMFT IHRSTGTISVSSGLD 180
N-cadherina_CDH2_	SKPGTYVMVTATDADD-PNALNGMLRYRISQAPSTPSPNMFT INNETGDIITVAAGLD 179
E-cadherina_CDH1_	RESFPTYTLVQAADLQGE---GLSTTATAVITVTDNDNPPIFNPTTYKGVPEANEV 237
P-cadherina_CDH3_	REKVPETLT IQATMDGD---GSTTTAVAYVEILDANDNAPMFDPQVYEAHVPENAVGH 237
N-cadherina_CDH2_	REKVQGYTLIQA TMEGNPTYGLSNTATAVITVTDNDNPEFTTAMTFYGEVPENRVDI 239
E-cadherina_CDH1_	VITTLKVTADAPNTPAWEAVYTILN-DGGGFVVTNPNVNDGILKTAKGLDFEAKQGY 296
P-cadherina_CDH3_	EYQRLTVTDL DAPNSPAMRATYLI MGGDGDGHFTITTHPESNGGILTTKGLDFEAKNGH 297
N-cadherina_CDH2_	IYANLTVTDKQDHPHTANNAVYRISGGDPTGRFAI QTDPSNDGLVTVYKPIDFE TNRMF 299
E-cadherina_CDH1_	ILHVAVTNVVPEVSLTT---STATVTVDVLDVNEAPIFVPPEKRVEVSEDFVGQGEITS 353
P-cadherina_CDH3_	TLYVEVTNEAFVYLKPT---STATIYVHVEDVNEAPVFPVPSKVVEVQEGIPTGEPCV 354
N-cadherina_CDH2_	VLTVAAENQVPLAKGI QHPPGSTATVSVTVDVNEPNYFAPNPKIIRGE EGLHAGTMLTT 358
E-cadherina_CDH1_	YTAGPDTFMEQKITRYRIWRDTANWLE INPDTGAI STRAELDREDFEHVKNSTYALIIA 413
P-cadherina_CDH3_	YTAEDPK-E NQKISYRILRDPAGWLANDPDSGGVTAVGTL DREDEGFYRNNIYEVWVLA 413
N-cadherina_CDH2_	FTAGDPDRYMQNIRYTKLSDPANWLIKIDPVNGQITTI AVL DRES-PNVKNNIYNATFLA 418
E-cadherina_CDH1_	TONGSPVATGTGTL LLL ILSDVNDNAPIPEPRTIFF CER-NPKQVINII DADLPNTSPF 472
P-cadherina_CDH3_	MDNGSPPTGTGTL LLL TLIDVNDHGPVPEPQITICNG-SPVRQVLNITDKDLSPTSPF 472
N-cadherina_CDH2_	SDNGIPPNSTGTGTLQI YLLDINDNAPQWLPQEAETCETPDPSINI TALDVIDPNAGPF 478
E-cadherina_CDH1_	TAELTHG-ASANNITIQYNDPTQESI ILKPK-MALEVGDYKINLKLMDNQ--KQGVTTLE 528
P-cadherina_CDH3_	QAQLTDD-SDIYWTAEVNE-EGDTVVL SLK-KFLKQDYDVHLSLSDHGN--KEGLTVIR 527
N-cadherina_CDH2_	AFDLPLSPYTIKRNIITITRLNGDFAQLNLKIKFLEAGIYEVPII ITDSGNPPKSNISILR 538
E-cadherina_CDH1_	YSYCDCEGAA GVCRAQPV EAGLQIPATLGILGGI LALLTIL LLLFLRRR---AVVKE 585
P-cadherina_CDH3_	ATYCDCHGVETC--PGPWKGGFILP---VLGAVLALLFL LVL LLLYRKK---RKIKE 578
N-cadherina_CDH2_	VKVQCDSDNGDCTDVRIVGAGLGTGATIAILLCI IILLILVLMFVVMKRRDKERGAQK 588
E-cadherina_CDH1_	PLLPEDDTRDNVYYYDEEGGGEEDQDFLSQLHRG----LDARPEVT-RNDVAPTLMSV 640
P-cadherina_CDH3_	PLLPEDDTRDNVYYYGEEGGGEEDQDYITQLHRG----LEARPEVVL RNDVAPTI IPT 634
N-cadherina_CDH2_	LLIDPEDDVRDNI LKYDEEGGGEEDQDYLSQLQQPDTVEPDAI KPVGIRRMDERPIHAE 658
E-cadherina_CDH1_	PRYLPRPANPD--EIGNFI DENLKAADTPTAPPYDSSLVFDYEGSGSEASLSSLNSSE 698
P-cadherina_CDH3_	PMYRPRPANPD--EIGNFI IENLKAANTPTAPPYDSSLVFDYEGSGSDAASLSSLTSSA 692
N-cadherina_CDH2_	PQYPVRSAAHPGDIGDIFINEGLKAADNDPTAPPYDSSLVFDYEGSGSTAGSLSSLNSSS 718
E-cadherina_CDH1_	SDKQGDYDYLNEWGNRFKKLADMYGGGEDD 728
P-cadherina_CDH3_	SDQGDYDYLNEWGSRFKKLADMYGGGEDD 722
N-cadherina_CDH2_	SGGEGDYDYLNDWGNRFKKLADMYGGGDD- 747

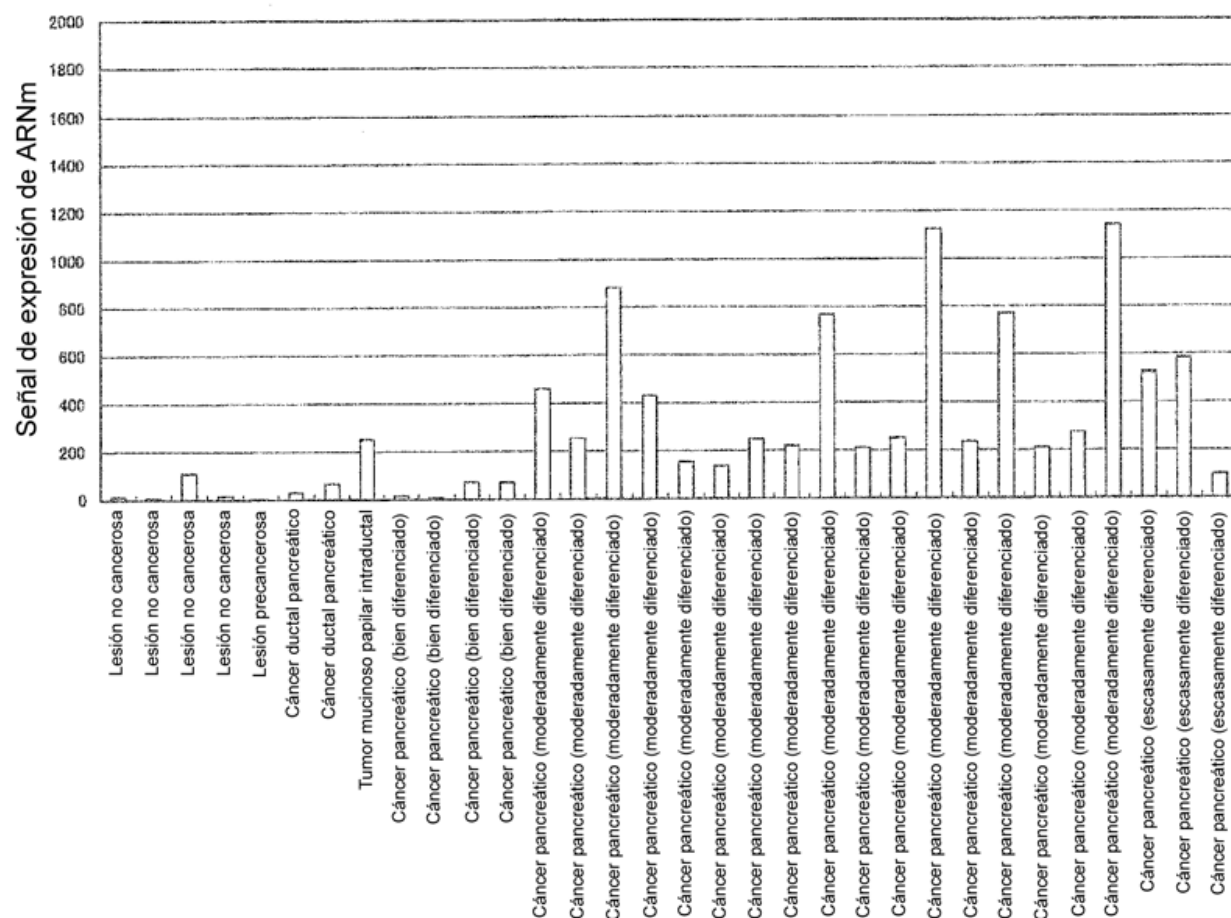
[Fig. 2]



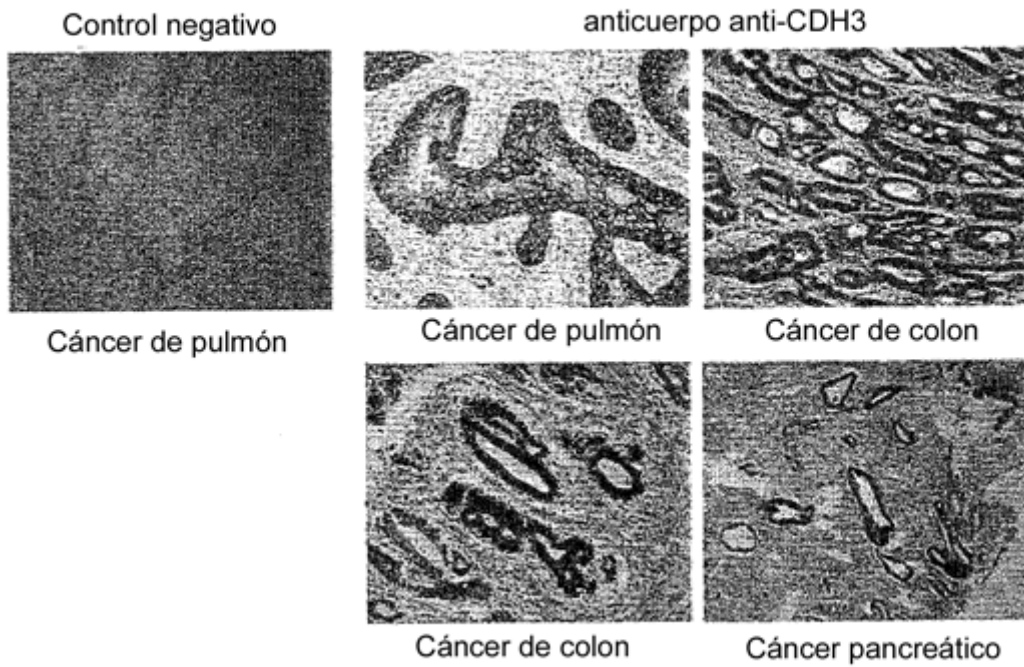
A



C

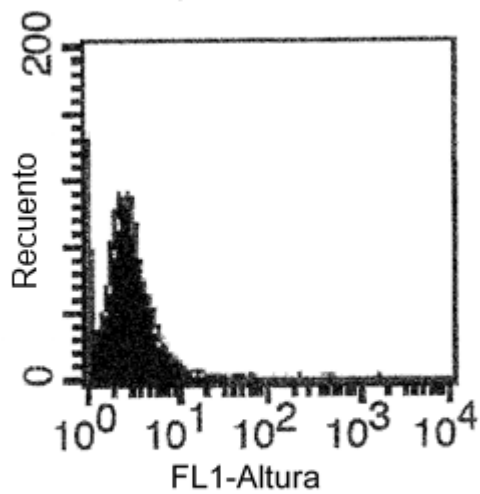


[Fig. 4]



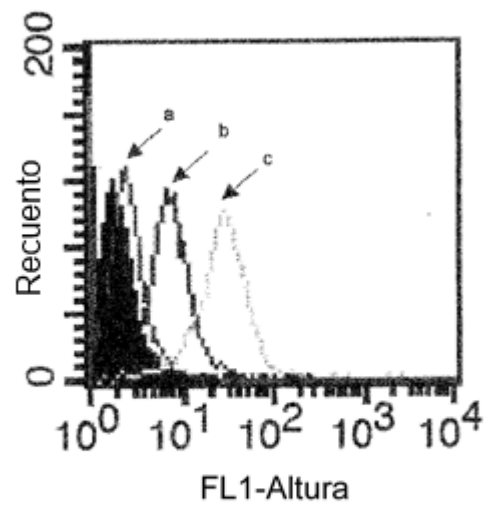
[Fig. 5]

A:



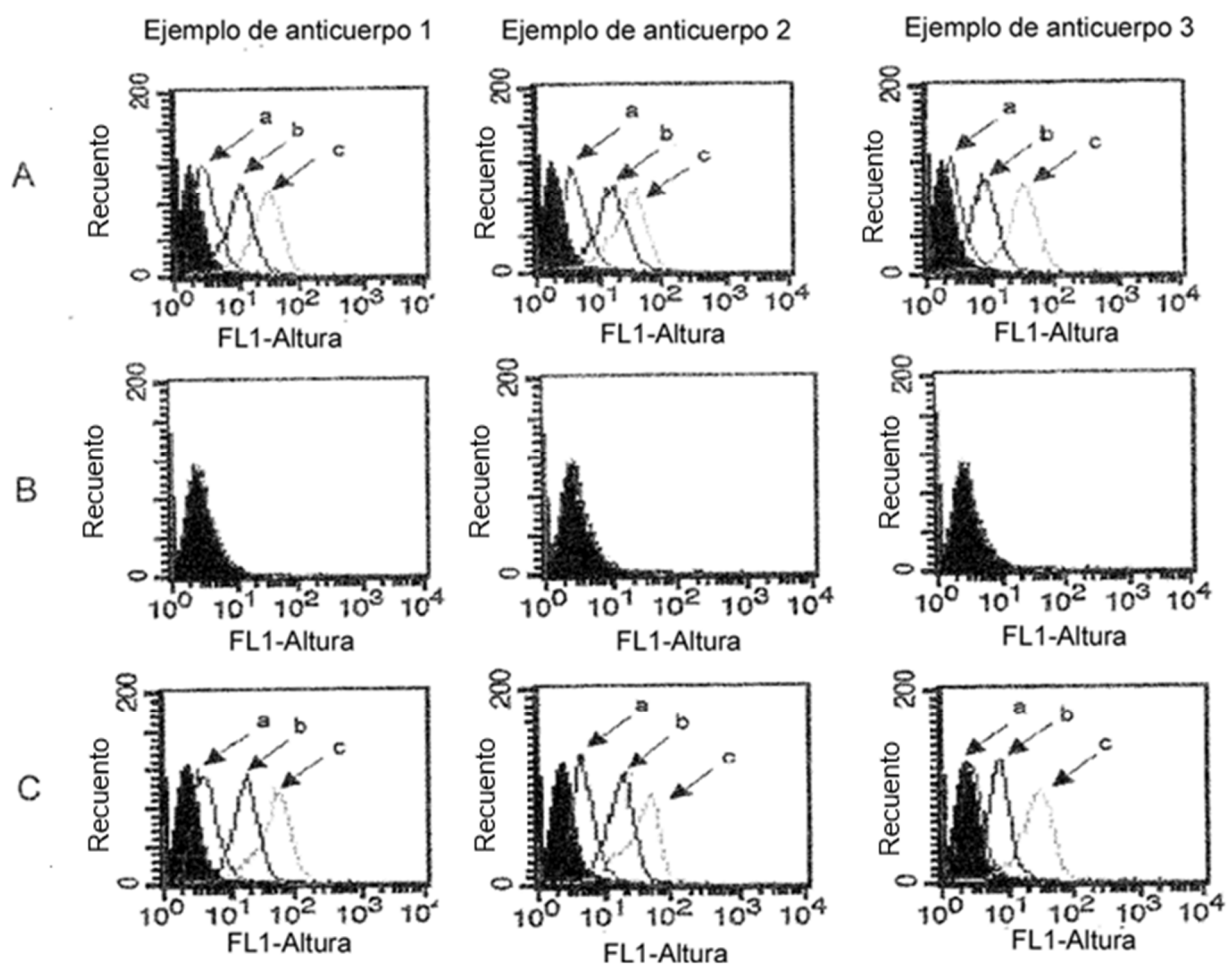
CHO

B:



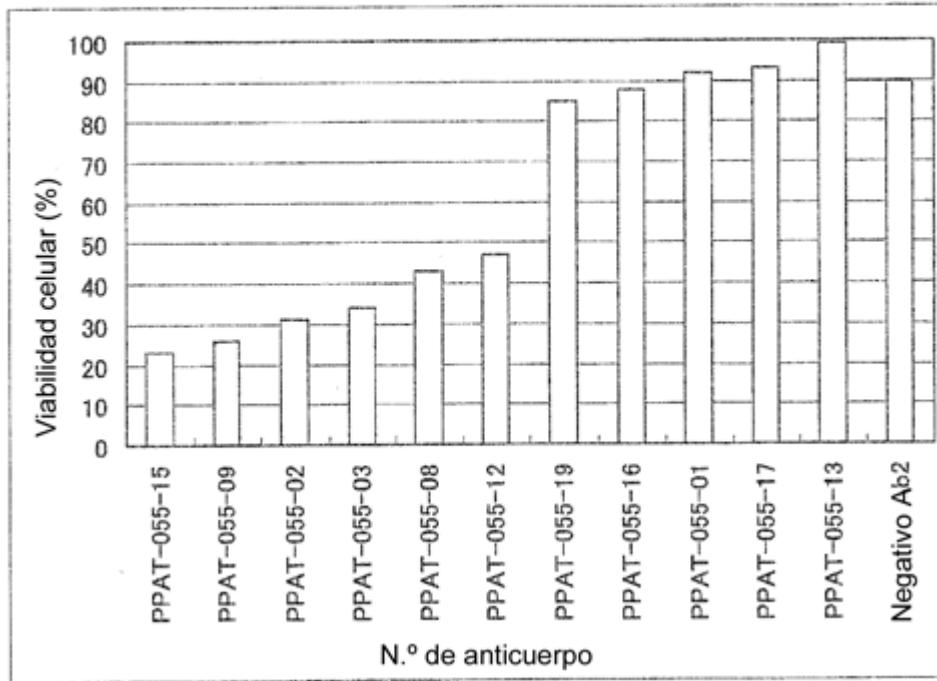
CHO forzada a expresar CDH3

[Fig. 6]

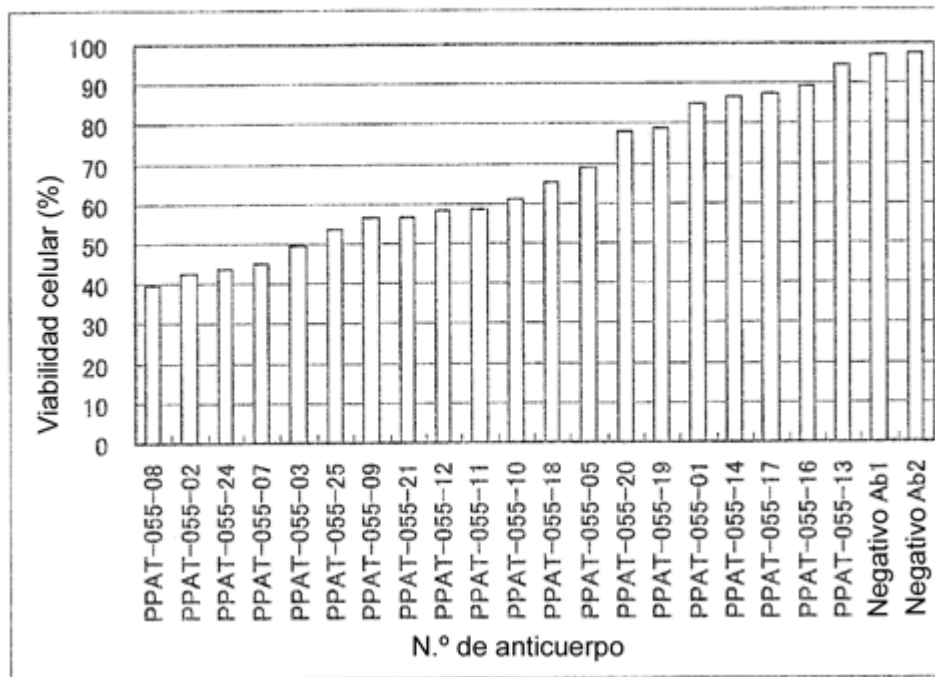


[Fig. 7]

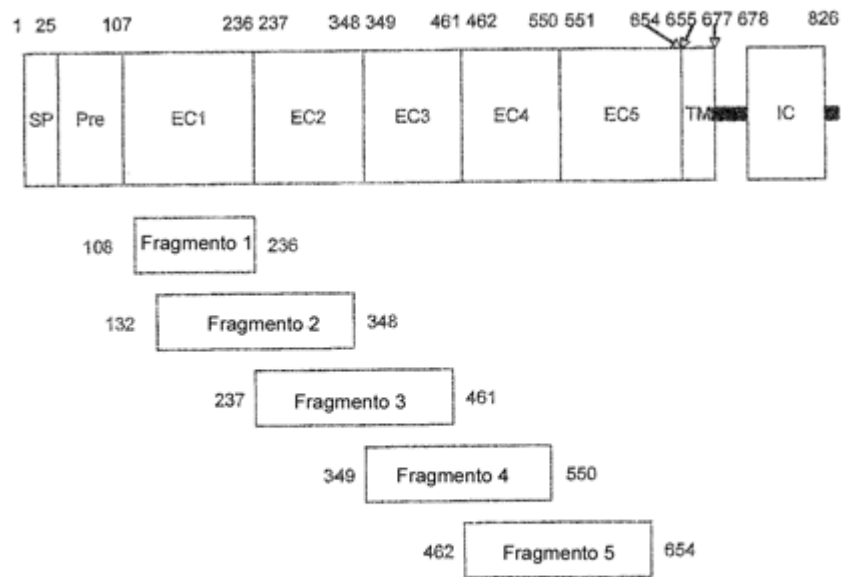
A



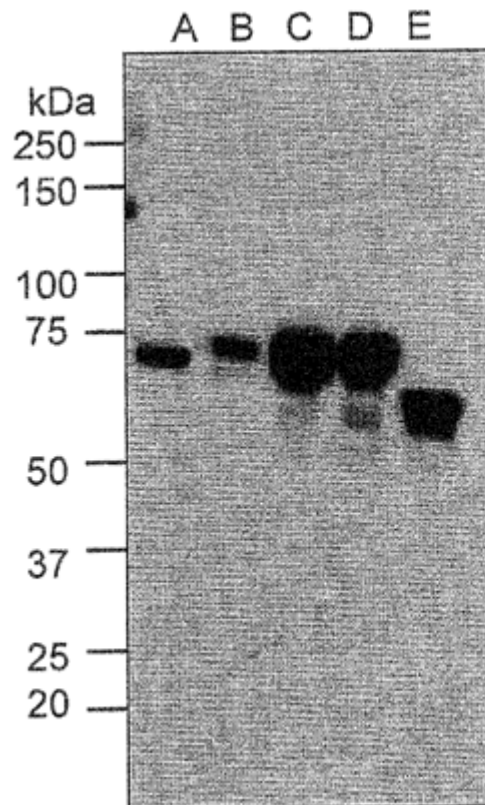
B



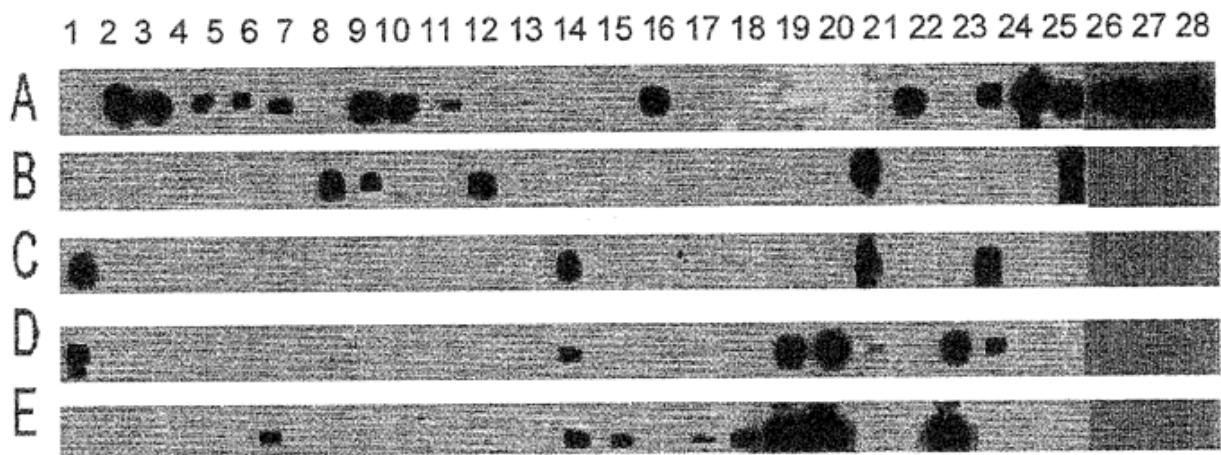
[Fig. 8]



[Fig. 9]



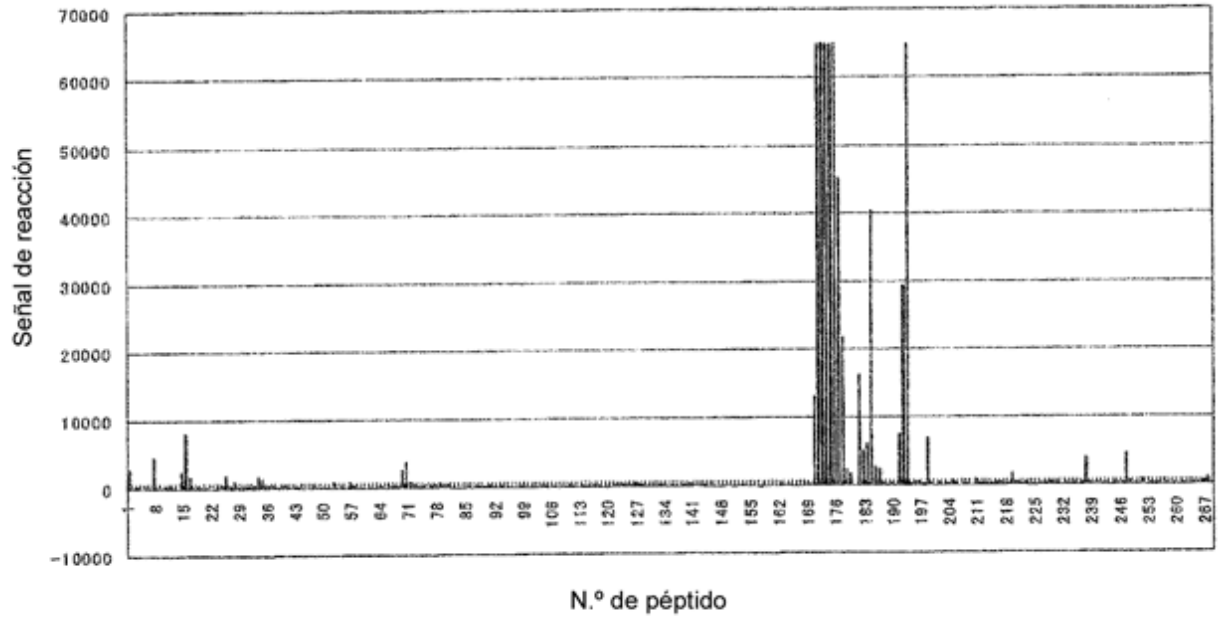
[Fig. 10]



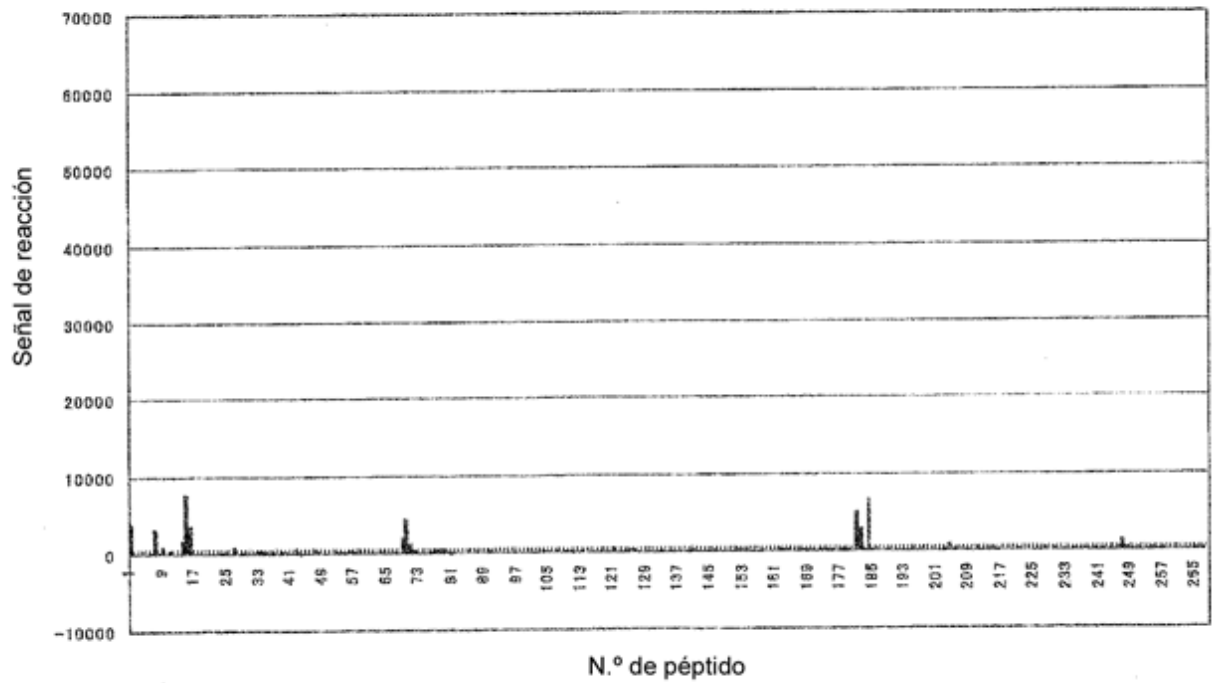
Carril	N.º de anticuerpo
1	PPAT-055-01
2	PPAT-055-02
3	PPAT-055-03
5	PPAT-055-05
7	PPAT-055-07
8	PPAT-055-08
9	PPAT-055-09
10	PPAT-055-10
11	PPAT-055-11
12	PPAT-055-12
13	PPAT-055-13
14	PPAT-055-14
15	PPAT-055-15
16	PPAT-055-16
17	PPAT-055-17
18	PPAT-055-18
19	PPAT-055-19
20	PPAT-055-20
21	PPAT-055-21
27	PPAT-055-25
28	PPAT-055-24

[Fig. 11]

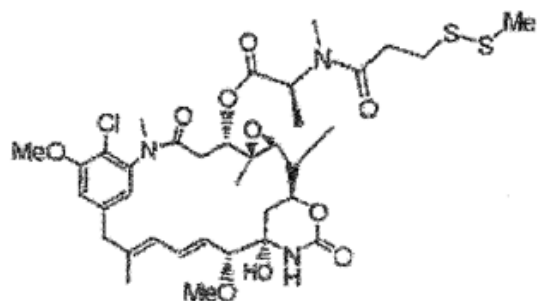
A



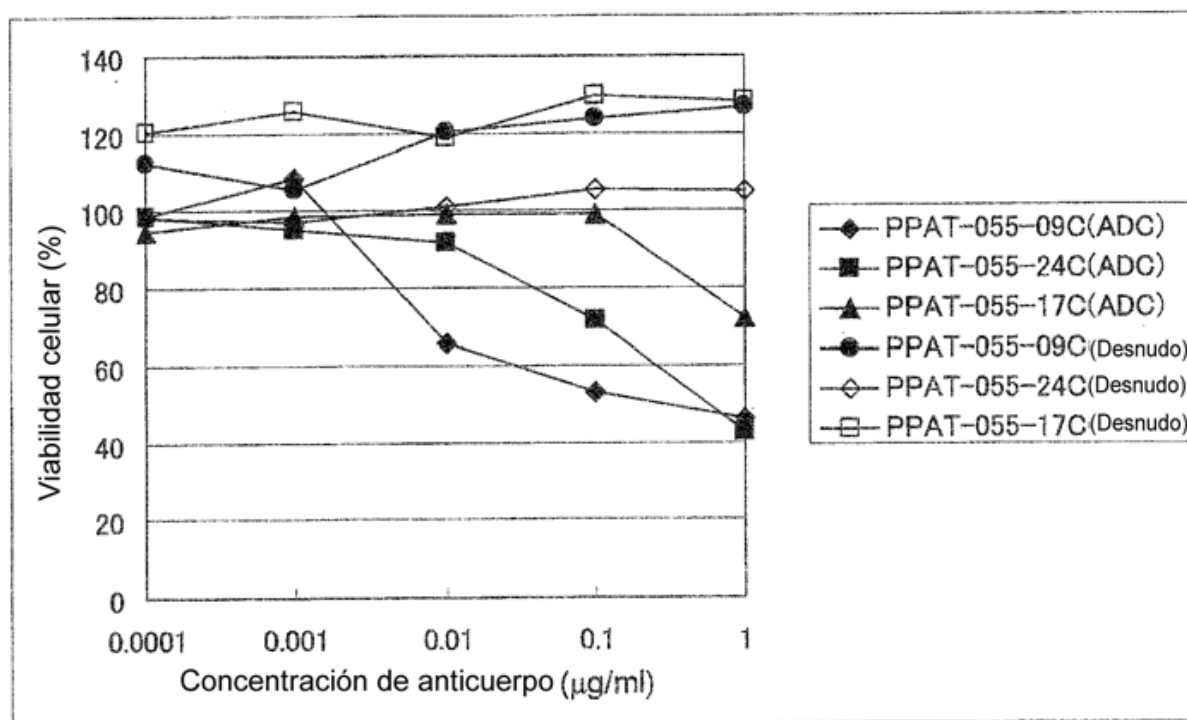
B



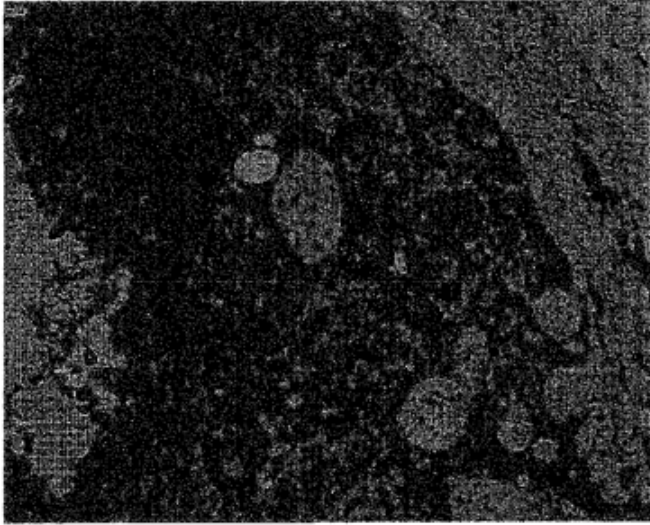
[Fig. 12]



[Fig. 13]



[Fig. 14]



[Fig. 15]

